

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Biología Celular



**EVOLUCIÓN ONTOGENÉTICA DE UN SISTEMA DE
NEUROTRASMISIÓN EN ENCÉFALO Y MÉDULA DE
RATA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

María Jesús López Juez

Bajo la dirección de la doctora
Rosario García Cordovilla

Madrid, 2007

- **ISBN: 978-84-669-3155-7**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular

**“EVOLUCIÓN ONTOGENÉTICA DE UN SISTEMA DE
NEUROTRANSMISIÓN EN ÉNCEFALO Y MÉDULA DE RATA”**



MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Maria Jesús López Juez

Bajo la dirección de la Doctora

Rosario García Cordovilla

Madrid 2007

**EVOLUCIÓN ONTOGENÉTICA
DE UN SISTEMA DENEUROTRANSMISIÓN
EN ENCÉFALO Y MÉDULA DE RATA.**

Memoria presentada para optar al grado de
Doctora en Ciencias Biológicas

Maria Jesús López Juez

Dirigida por la profesora

Rosario García Cordovilla

Departamento de Biología Celular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid

Agradecimientos

*A mi familia, José Antonio, Guillermo y Carmen,
por el tiempo para realizar este trabajo.*

*A mi directora de tesis por confiar en mi capacidad
para llevar a cabo esta tesis.*

*A todas las personas con lesión cerebral que han
sido una inspiración de firmeza,
determinación y ganas de vivir.*

Índice	V
Propósito General	IX
I. INTRODUCCIÓN	
Introducción	1
GABA.....	5
Entorno iónico.....	11
Sinapsis GABAérgicas.....	16
Enzima de síntesis – GAD.....	21
Receptores del GABA.....	24
Historia	24
Receptor GABA-A	29
Receptor GABA-B	36
Receptor GABA-C.....	43
Otras funciones del GABA.....	44
Papel neurotrófico y promotor de la migración	44
Protector.....	46
Modelador de circuitos – Osciladores	47
Promotor de la sinaptogénesis	47
Miscelánea.....	47
El neurotransmisor GABA en el cerebro de rata adulta	48
Coordenadas temporales	48
Distribución del neurotransmisor GABA en el cerebro de rata adulta	49

Apéndice a la introducción: Desarrollo embrionario de la rata.....	74
--------------------------------------------------------------------	----

II. MATERIAL Y MÉTODOS

Introducción	112
Búsqueda bibliográfica	113
Bases de datos en neurociencia	116
Descriptores de la tesis	118
Elaboración de la ecuación de búsqueda.....	119
Resultados de búsqueda en Medline	120
Resultados de búsqueda en Internet.....	122
Mapas cerebrales	123
Herramientas de informática.....	129

III. RESULTADOS

Introducción	133
Resultados durante el desarrollo embrionario: ED-11, ED-12, ED-13, ED-14, ED-15, ED-16, ED-17, ED-18, ED-19, ED-20.....	133
ED-21. Final del desarrollo embrionario.	160
ED-22. Resultados del día del nacimiento. Inicio de la etapa postnatal.	162
Coordenadas temporales	163
Coordenadas espaciales	166
Coordenadas funcionales.....	169

PND-1: medula espinal, cerebelo, tálamo, hipocampo, corteza, otros sistemas.....	171
Periodo neonatal: PND-2 / PND-7	179
Periodo inmaduro: PND-8 / PND-14	183
Periodo adolescente: PND-15 / PND-21	186
Periodo juvenil: PND-22 / PND-28	189

IV. DISCUSIÓN

4.1.Existe un gradiente caudo-cefálico de aparición del GABA a lo largo del desarrollo embrionario de la rata.....	198
4.2.La aparición del GABA no está restringida a ciertos núcleos anatómicamente determinados, sino que lo hace como una red extensa y difusa que cubre todos los niveles cerebrales estudiados.....	198
4.3. Existe un periodo de maduración postnatal para lograr los niveles del adulto	200
4.4.En los periodos embrionarios y postnatal temprano, el GABA actúa como neurotransmisor despolarizante de la membrana postsináptica.....	201
4.4.1. ¿Qué sentido biológico puede tener el hecho de que el NT inhibidor mas importante actúe como despolarizante durante el desarrollo embrionario y las primeras etapas de desarrollo postnatal? El aprendizaje biológico.	202
4.4.2. Papel del receptor GABA-A en el cambio de función	206
4.4.3. El papel del ión Cloro.....	215

4.5. Vuelve a aparecer un gradiente de maduración funcional caudo-cefálico; el GABA pasa de actuar como despolarizante a hiperpolarizante de la membrana postsináptica.	224
4.6. Cuando se alcanza la edad adulta el GABA esta plenamente maduro tanto a nivel anatómico como a nivel funcional, convirtiéndose en el neurotransmisor inhibitor más importante del SNC de vertebrados.	229
V. CONCLUSIONES	245
VI. BIBLIOGRAFÍA	247
VII. APÉNDICES	294
Abreviaturas	294
Índice de figuras	297

PROPÓSITO GENERAL.

Uno de los fines últimos de la ciencia es dar respuesta a las preguntas que se plantea el cerebro de un ser humano. En el campo de las neurociencias nos planteamos muchas preguntas pero no siempre obtenemos respuestas; la mayoría de las veces obtenemos más preguntas. Una de las líneas de trabajo fundamentales de la neurociencia actual, trata de correlacionar la estructura con la función cerebral, en pro de una mejor comprensión del funcionamiento del sistema. En este contexto, todo modelo que nos permita entender mejor la estructura y la función del SNC debe tener en cuenta los procesos de excitación y los procesos de inhibición.

Nos planteamos como propósito de este trabajo explorar la estructuración de una de los pilares básicos del funcionamiento cerebral: la inhibición, en particular de uno de los neurotransmisores inhibidores mas importantes que existen: el **Ácido Gamma-amino-butírico**. Por lo tanto el objetivo de esta tesis es recopilar los conocimientos actuales sobre la distribución del neurotransmisor GABA durante el desarrollo del cerebro de rata; para intentar comprender como integra el cerebro parte de la función inhibidora hasta llegar a la estructura del adulto.

Para ello vamos a realizar una introducción general que revise los datos básicos del NT GABA, su estructura, síntesis, receptores, sitios de acción, etc. Así como su distribución en sistema nervioso central durante la vida adulta. En la introducción adjuntaremos un apéndice, resumiendo el desarrollo embrionario del sistema nervioso central de la rata. En el capítulo de resultados mostraremos los mapas cerebrales embrionarios y postnatales tempranos, así como la aparición paulatina del GABA en las distintas áreas. En la discusión analizaremos la significación biológica de los aspectos relacionados con la aparición del GABA en el SNC de rata. Todo ello para llegar finalmente a presentar nuestras conclusiones.

A lo largo de la realización del trabajo de recopilación de datos de esta tesis, nuestra apreciación del neurotransmisor GABA ha ido cambiando, en algunos momentos de forma pausada y en otros casos de forma rápida, pero en todo momento este proceso ha provocado una reflexión sobre su significado.

Por ello en este trabajo apostamos por ***la integración de información que es fundamental para generar conocimiento.***

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción

En estos días de verano que celebramos el aniversario de la llegada del hombre a la luna, he tenido una conversación con uno de los ingenieros de la NASA que participó en la fabricación de una pequeña pieza de aquel engranaje y comentábamos lo espectacular de aquel viaje del hombre. Lo apasionante y magnifico que debió ser contemplar la Tierra desde la Luna por primera vez. Nuestra divagación filosófica fué derivando hacia el cerebro humano, que había hecho posible ese “viaje exterior” y comenzamos a hablar de la otra frontera en la cual estamos explorando: “el viaje interior”, la aventura del conocimiento del propio cerebro humano. Del mismo modo que este ingeniero, que participó trabajando en una pequeña pieza, nosotros en este trabajo solo pretendemos dar una pincelada más, que permita continuar con ese proyecto que algún día culminará con el conocimiento del funcionamiento cerebral.

El interés por el estudio del cerebro humano se remonta probablemente al inicio de la historia del *homo sapiens* como lo sugiere el hecho de que desde hace milenios se conoce el uso de drogas psico-activas que actúan sobre el cerebro e influyen en su comportamiento.

En los papiros egipcios (“Edwin Smith Surgical Papyrus”) escritos en el siglo XVII antes de Cristo, ya aparecen las primeras referencias escritas. Según su traductor – James Breasted – en este papiro se describen los síntomas, diagnostico y pronostico de dos pacientes, heridos en la cabeza y con fracturas de cráneo¹.

El texto atribuido a Hipócrates (siglo V a.d.C.) hace una descripción que pone las bases para el paradigma actual del conocimiento:

“El hombre debe saber que del cerebro y solo del cerebro, surgen los placeres, alegrías, risas y bromas, así como nuestros pesares, dolores, aflicciones y

lagrimas. A través de él, en particular, nosotros pensamos, vemos, oímos y distinguimos lo feo de lo hermoso, lo malo de lo bueno, lo agradable de lo desagradable”¹.

La complejidad del cerebro hace que se haya abordado su estudio desde muy diferentes puntos de vista: comenzando por el comportamiento, progresando hacia un mayor conocimiento de la estructura y función, tanto a niveles macroscópicos como microscópicos, histológicos, celulares, genéticos y moleculares, desde perspectivas antropológicas, evolutivas y del desarrollo; a nivel de comunicación entre los organismos, las células, las moléculas, etc.

Podríamos afirmar sin miedo a equivocarnos que Cajal marca un punto de inflexión en el conocimiento cerebral y desde él a nuestros días, el viaje del conocimiento ha sido apasionante. Son muy numerosos los trabajos que aparecen como piezas de un puzzle que no siempre pueden encajarse con nitidez para formar un paradigma central. La neurociencia aun no consigue explicar completamente la complejidad / simplicidad del conjunto. Y las respuestas a las grandes preguntas del ser humano se nos escapan como arena de playa entre los dedos de las manos.

De todos los posibles enfoques desde los cuales nos podemos acercar al estudio del cerebro, quizás el citológico sea el más apasionante. La célula es la unidad básica de la vida, tal y como la conocemos en los organismos eucariotes pero además en los organismos pluricelulares la comunicación entre ellas adquiere una nueva dimensión en la actuación celular. Es por ello que en nuestro trabajo nos hemos sentido irremisiblemente atraídos por las neuronas como unidades básicas del cerebro y por los neurotransmisores como unidades básicas de comunicación.

Y puesto que, hasta donde conocemos, el comportamiento animal esta basado en procesos bioquímicos, ¿cómo se estructura la respuesta comportamental a un estímulo recibido?. Parece que la interacción entre un ser vivo y su entorno, tanto externo como interno, está organizado en base a como el ser vivo recibe la

información de entrada – inputs sensoriales- la procesa en diferentes niveles de análisis – medula, puente, mesencéfalo, diencefalo, cortex – y finalmente da una respuesta motora – outputs motores – y el conjunto de todos ellos – fisiológicos, motor, lenguaje etc. – produciendo respuestas complejas que forman el comportamiento global del individuo². El paradigma actual de la neurociencia se basa en el hecho de que todo acto de un ser vivo, que presente sistema nervioso central, esta basado en el funcionamiento de un circuito cerebral, aunque este aun no haya sido descrito en la actualidad³. El equilibrio entre la información de entrada y de salida parece ser un punto decisivo de todo el proceso, es aquí precisamente donde la inhibición debe jugar un papel relevante. Filogeneticamente hablando a mayor grado de complejidad en la respuesta y por tanto de procesamiento de la información en las redes neurales, mayor grado de sofisticación a nivel de la inhibición⁴.

Las moléculas encargadas de la comunicación entre las neuronas **-los neurotransmisores-** se pueden clasificar de forma genérica en⁵:

1. Excitadores: Aquellos que producen una despolarización en la membrana postsináptica, como por ejemplo el ácido Glutámico y ácido Aspártico.
2. Inhibidores: Aquellos que producen una hiperpolarización en la membrana postsináptica, como por ejemplo el GABA en la edad adulta y glicina.
3. Otros ejercen una acción cambiante, tanto despolarizante como hiperpolarizante, según el tipo de receptor postsináptico sobre el que actúan, como por ejemplo la acetil-colina, la serotonina, etc.

Es sorprendente que dos neurotransmisores como son el ácido glutámico - excitador – y el GABA –inhibidor- aparezcan en toda la escala filogenética, desde los organismos mas simples hasta los mas complejos, y muchos investigadores como Butler & Hodos, piensan que fueron las primeras moléculas que actuaron como neurotransmisores en la evolución⁵.

Cabe preguntarse por la relación que existe entre ambos; escasas diferencias a nivel bioquímico producen a nivel funcional cambios tan bruscos como el paso de

la excitación a la inhibición. Por un lado el glutámico como neurotransmisor excitador ejerce un papel importante y muy beneficioso para el sistema: la transmisión excitadora, su papel relevante y/o tal vez imprescindible en la memoria y en el aprendizaje, en el crecimiento neural y en la diferenciación.

Simultáneamente su efecto puede ser dañino para el tejido cerebral; esto ocurre cuando grandes cantidades de él son liberadas al espacio extracelular y se produce una hiperactivación de sus receptores, en un proceso que se ha denominado “excitotoxicidad” y que es de común observación en procesos como la isquemia cerebral, las convulsiones epilépticas y los trastornos neurodegenerativos⁶.

Por todo ello el estudio del GABA en su función como neurotransmisor inhibidor, tal como se encuentra distribuido en el cerebro del animal adulto, así como el desarrollo pre y postnatal, nos pueden permitir comprender mejor el papel de la inhibición y su influencia sobre la excitación y sobre los mecanismos que gobiernan el comportamiento.

Por ello vamos a desarrollar varias partes en la introducción a este trabajo:

1. Descripción de la molécula de GABA.
2. Descripción de la distribución del GABA en el animal adulto.
3. Apéndice a la introducción: Desarrollo embrionario del sistema nervioso o neurogénesis de la rata.

Nos planteamos como objetivo de esta tesis buscar en que momento del desarrollo embrionario se detecta el GABA o su enzima de síntesis, por primera vez en las distintas áreas cerebrales. Finalmente en la discusión, intentaremos encontrar un significado fisiológico y comportamental a la evolución estructural de la inhibición, en el cerebro de rata.

1.2. Descripción de la molécula del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico.

El ácido γ -aminobutírico - GABA según sus iniciales en inglés - es un neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso de invertebrados y en el sistema nervioso central de vertebrados⁷. El GABA también se ha detectado en otros tejidos como los Islotes del páncreas y en la glándula adrenal¹. En el S.N.C. de vertebrados su concentración es mayor que la de ningún otro NT conocido y quizás entre un 25% y un 45% de todas las terminales lo contengan⁸, pero existen áreas que presentan altas densidades de GABA, como el estriado donde cerca del 95% de los cuerpos celulares son gabaérgicos⁶. Se piensa que la concentración del GABA, a nivel global, sea de 100 a 1000 veces superior a otros NT como las catecolaminas, la serotonina o la acetil colina¹.

Pertenece a la familia de neurotransmisores con estructura química de aminoácidos. Este dato es interesante: existen neuronas cuyo neurotransmisor es una molécula específica y ello implica una activación génica específica, que permite la síntesis de esa determinada molécula. En cambio existen poblaciones de neuronas que usan aminoácidos como neurotransmisores, y estos aminoácidos esenciales son constituyentes universales de todas las células⁹.

El GABA fué descubierto en tejido cerebral en 1950¹⁰, con los estudios de Awapara, Roberts y Frankels y Udenfriend, posteriormente se observó su acción inhibitoria sobre la unión neuromuscular de crustáceos¹¹ y finalmente en corteza cerebral de mamíferos^{7, 12}.

Los criterios que se usan para identificar un NT son los siguientes¹²:

1. Debe demostrarse que el transmisor se encuentra en terminales pre-sinápticas de la sinapsis y en las neuronas desde las cuales se originan esas terminales.
2. El transmisor debe descargarse desde la terminal pre-sináptica de manera concomitante a la actividad nerviosa pre-sináptica.

3. Al aplicarlo experimentalmente en las células diana, los efectos del transmisor putativo deben ser idénticos a los efectos de la estimulación de la vía pre-sináptica.

A principios de los años 70, la disponibilidad de antagonistas selectivos¹³ y potentes del GABA, hizo que se trabajara intensamente sobre esta molécula y finalmente fuera aceptada como sustancia neurotransmisora⁷. Posteriormente se fue poniendo de manifiesto, que junto con este papel fundamental en que actúa como principal neurotransmisor inhibitor en el cerebro de mamíferos, el GABA puede ejercer otras funciones como promotor de la sinaptogénesis¹⁴.

La clasificación de los neurotransmisores basados en su estructura química, nos permite ver dos grandes familias: los aminoácidos y las aminas biogénicas⁶. El GABA presenta una estructura química de aminoácido monocarboxílico, al igual que otros neurotransmisores inhibidores como la glicina, frente a neurotransmisores excitadores, que en general, tienen estructura de aminoácidos dicarboxílicos como el ácido glutámico o como el ácido aspártico. Algunos autores definen al GABA como neurotransmisor de clase II -es decir aminoácidos- de molécula pequeña y acción rápida en el S.N.C.¹⁵.

La síntesis de GABA se realiza a través de una enzima Ácido glutámico descarboxilasa (GAD en sus siglas en ingles), que usa como sustrato el ácido glutámico, esta enzima produce una descarboxilación y requiere la presencia de piridoxal fosfato como coenzima¹.

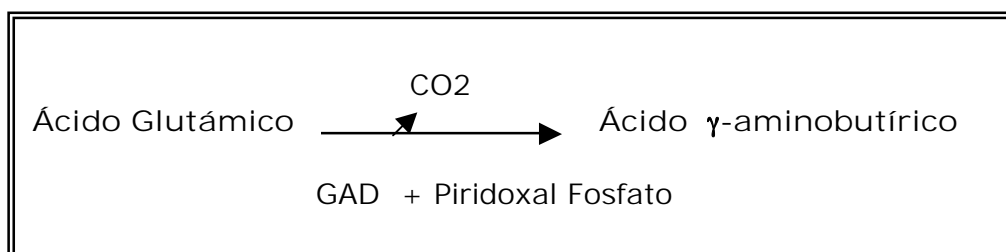


Figura 1.1¹

Aunque la síntesis de GABA está inmersa en un conjunto metabólico mucho mas amplio, donde además están incluidos otros aminoácidos que actúan en la neurotransmisión y que en general provienen del ciclo de Krebs^{1,6}. En este proceso metabólico están implicadas tanto neuronas como células de la glía, en particular astrocitos¹⁶.

Una vez se ha sintetizado el GABA, este se almacena en vesículas presinápticas hasta el momento de su liberación en la brecha sináptica, formando lo que se conoce como sinapsis GABAérgicas.

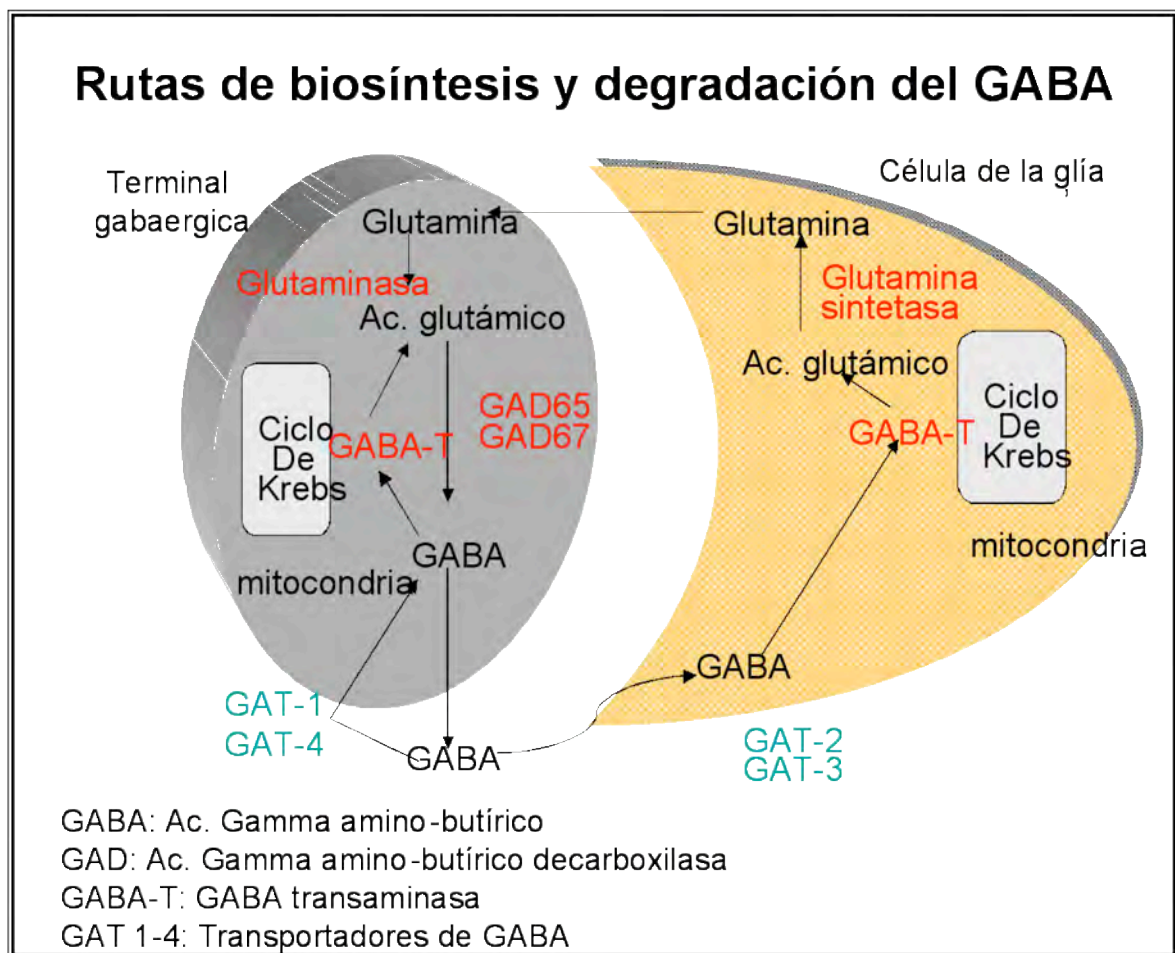


Figura 1.2.⁶

Liberado a la brecha sináptica, el GABA ejerce su función actuando sobre receptores específicos. Los estudios farmacológicos muestran que existen tres

grandes tipos de receptores de GABA: El receptor GABA-A, el receptor GABA-B y el receptor GABA-C. La respuesta de cada uno de ellos es diferente. Se cree que el receptor GABA-A es típicamente post-sináptico y en cambio el receptor GABA-B esta presente en las membranas pre- y post-sinápticas. El receptor GABA-A media la respuesta rápida inhibitoria del GABA en la membrana postsináptica^{1, 6}. Mientras que el receptor GABA-B al estar localizado en la membrana presináptica estaría implicado en la regulación del sistema¹. Como veremos mas adelante el papel del GABA-C aún se mantiene controvertido.

Para la eliminación del GABA, este es catabolizado por reacciones de transferencia del grupo amino para posteriormente entrar en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos¹⁷.

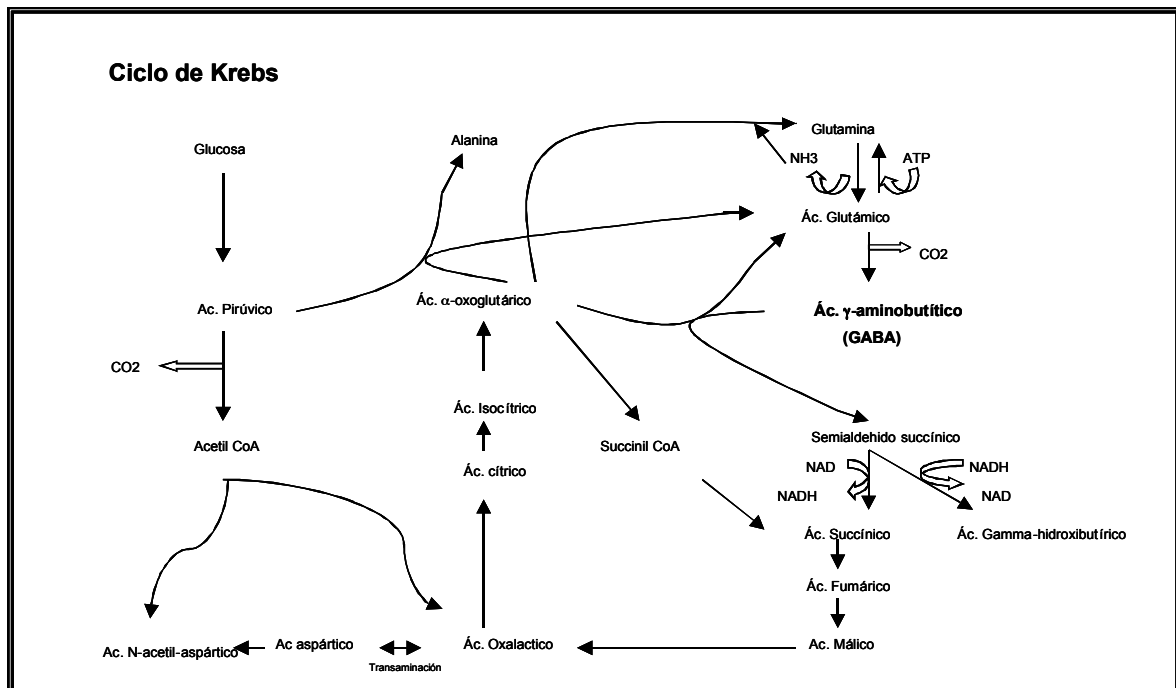


Figura 1.3 Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Ciclo de Krebs

La enzima ácido γ -aminobutírico transaminasa o GABA-T¹ es la encargada de realizar esta función. Esta enzima se encuentra localizada en la fracción mitocondrial de la célula, mientras la GAD que se encuentra localizada por lo general en el animal adulto, en la fracción de los sinaptosomas¹⁷.

Como veremos en el desarrollo de este trabajo, uno de los puntos más interesantes del estudio del GABA es su maduración ontogenética tanto prenatal como postnatal, que ocurre en todos los niveles del sistema: enzima de síntesis, receptores, etc. Esto mismo ocurre con la enzima GABA-T, hay una síntesis progresiva en diferentes áreas cerebrales durante la maduración. De forma que la aparición de la enzima GABA-T se correlaciona bastante bien con la bioquímica de maduración del sistema gabaérgico¹⁸.

Una vez que el GABA ha sido transformado en las mitocondrias en semialdehído succínico, este seguirá una ruta de reducción que llevará hasta el ácido gammahidroxibutírico o una ruta de oxidación hacia el ácido succínico, este es el denominado “GABA shunt”¹. La distribución en diferentes áreas del encéfalo de las enzimas del GABA- shunt, así como su cambio durante la ontogenia son otro elemento mas a tener en cuenta en el estudio de la maduración del sistema gabaérgico¹⁹.

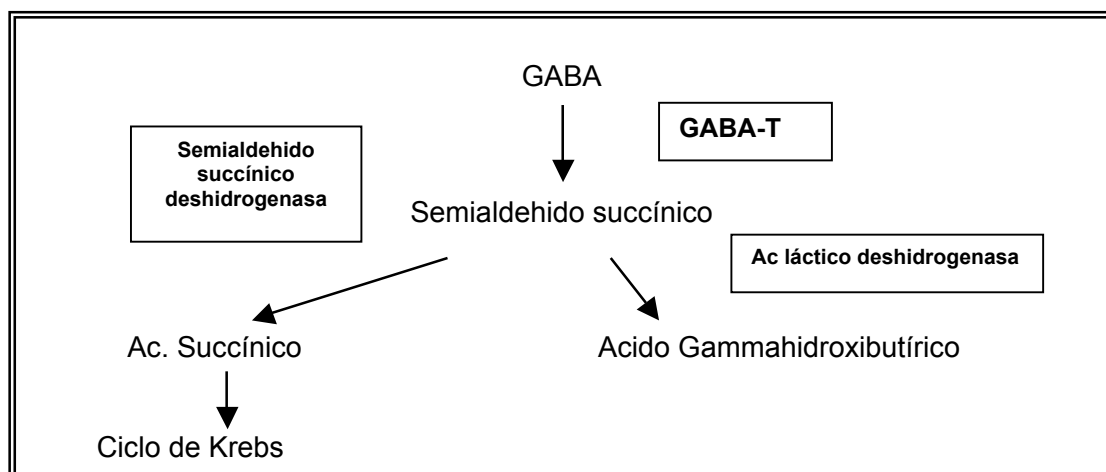


Figura 1.4 Ruta de degradación del GABA. GABA Shunt¹.

Pero previo a la degradación metabólica del GABA que se realiza como hemos explicado en el párrafo anterior esta molécula ha de ser retirada de la brecha sináptica; y en general podemos observar que la inactivación de sustancias

neuroactivas en la propia brecha sináptica, se puede realizar por dos mecanismos:

1. inactivación enzimática.
2. por re-captación dependiente de consumo de energía por parte de las neuronas o de las células glias¹⁷.

En el caso del GABA la retirada o re-captación, de la brecha sináptica, se realiza por un sistema dependiente de sodio $-Na^{+}$ -, tanto por las propias terminales GABAérgicas neuronales como por las células de glía que las rodean. Puede ser que mucho del GABA reciclado sea directamente reutilizado⁸. Esta recogida de GABA mediada por un transportador y dependiente de la concentración extracelular de iones sodio y cloro. La molécula de GABA se co-transporta con dos iones sodios y un ión cloro, utilizando los potenciales eléctricos formados por diferentes concentraciones de estos dos iones.

El transportador del GABA, correspondiente a este mecanismo, fue clonado en 1990 y se denominó GAT1. Los GAT2-4 fueron posteriormente clonados en base a su homología estructural con GAT1. Estos transportadores tienen 12 posibles dominios de transmembrana y no muestran ninguna similitud en la secuencia con otros transportadores previamente identificados, lo que podría indicar que los transportadores de GABA forman una familia génica a parte¹⁷.

De los 4 transportadores identificados hasta este momento, son el GAT-1 y GAT-4 los que se expresan en el sistema nervioso del ratón. Con análisis inmuno-electro-microscópicos se ha observado que GAT-1 está principalmente en las terminales pre-sinápticas, mientras que GAT-4 está presente en las células de glía. Pero mientras GAT-1 se expresa por todo el SNC, GAT-4 se observa fundamentalmente en las células de la glía del tálamo, puente y tronco del encéfalo. Además la expresión de estos diferentes transportadores es diferente a lo largo del tiempo durante el desarrollo lo cual puede implicar que jueguen algún papel en la diferenciación de los distintos tipos celulares²⁰. La expresión de los GAT-2 y GAT-3 en corteza cerebral de rata se ha visto que llega a los niveles del

adulto en PND-21, y concretamente GAT-3 se expresa abundantemente en corteza cerebral, se correlaciona con la expresión y las variaciones del propio GABA²¹.

En cuanto a la retirada del GABA de la brecha sináptica, se sabe que juega un papel importante las células de la glía y mas específicamente los astrocitos. La glutamina sintetasa, enzima de síntesis de la glutamina,

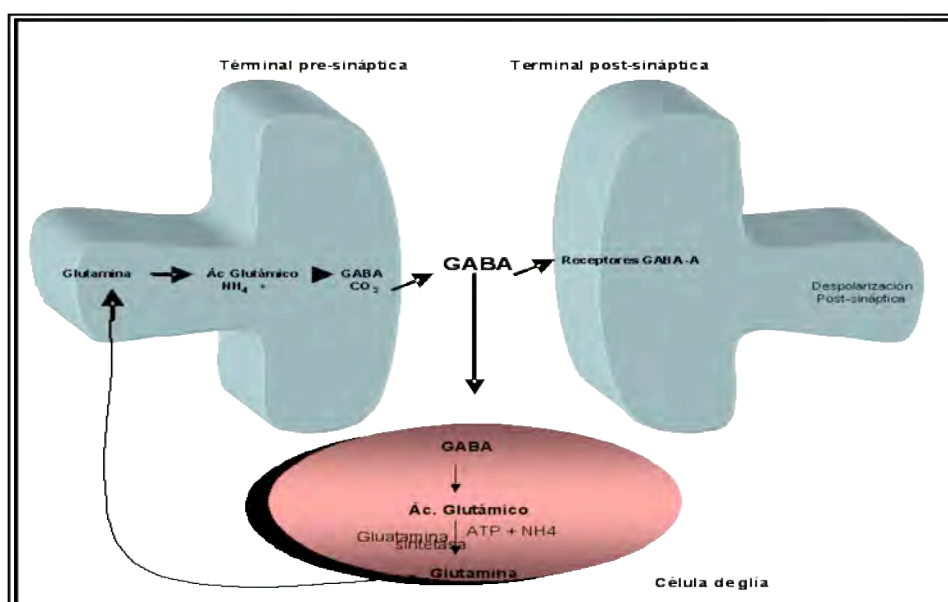


Figura 1.5¹⁶

es específica de astrocitos, esta enzima usa como sustrato el ácido Glutámico y el GABA para la síntesis de glutamina²². Esto le asigna un papel fundamental en el control entre la excitación y la inhibición. Además, sabemos que esta reacción consume amoníaco y por tanto sirve para mantener un entorno de baja toxicidad¹⁶.

1.3 Entorno iónico

La descripción electro-química de una sinapsis GABAérgica, podemos expresarla por el estudio de los diferentes iones y sus equilibrios, los potenciales de

membrana, las corrientes eléctricas generadas y las interacciones macromoleculares de las proteínas de membrana y los neurotransmisores. Es así tanto si funcionan como canales ionotrópicos como metabotrópicos. Vamos a describir los diversos elementos de dichas sinapsis:

- Neurona pre-sináptica liberadora de GABA
- Brecha sináptica y entorno químico
- Neurona post-sináptica expositora de receptores
- Neurona pre-sináptica expositora de receptores
- Células de la glía circundante

Una parte de la transmisión de información en el S.N.C. se realiza por el movimiento de iones que generan señales eléctricas. Entre ellos destacan el sodio (Na^+), potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y cloro (Cl^-)²³. Sabemos que estos iones pueden cruzar la membrana a través de proteínas trans-membrana denominadas “canales iónicos” y como los iones son partículas cargadas eléctricamente, estos flujos de iones son corrientes eléctricas a través de la membrana, con un efecto inmediato sobre el potencial de membrana²⁴. Es conocido que existe una distribución de iones asimétrica a ambos lados de la membrana celular y este hecho es independiente del medio en el cual viva el animal ya sea marino, agua dulce o terrestre²⁴, como es el caso que nos ocupa en la rata.

En el medio intracelular el ión predominante es el K^+ (Potasio) como catión y como aniones los predominantes son moléculas orgánicas cargadas negativamente: aminoácidos tipo Glutámico y aspártico, proteínas o ácidos nucleicos²⁴.

En el medio extracelular el catión mas abundante es el Na^+ -(Sodio) mientras que el anión mas abundante es el Cl^- (Cloro). No mencionamos el Ca^{2+} (Calcio) cuyo procesamiento es mas complejo y merecería una descripción mas detallada²⁴. Cada uno de los entornos, es neutro con respecto a sí mismo, pero la diferencia de concentración de ciertos iones entre el interior y el exterior se denomina

“gradiente de concentración” y genera un potencial de membrana ^{1, 6, 23, 24}.

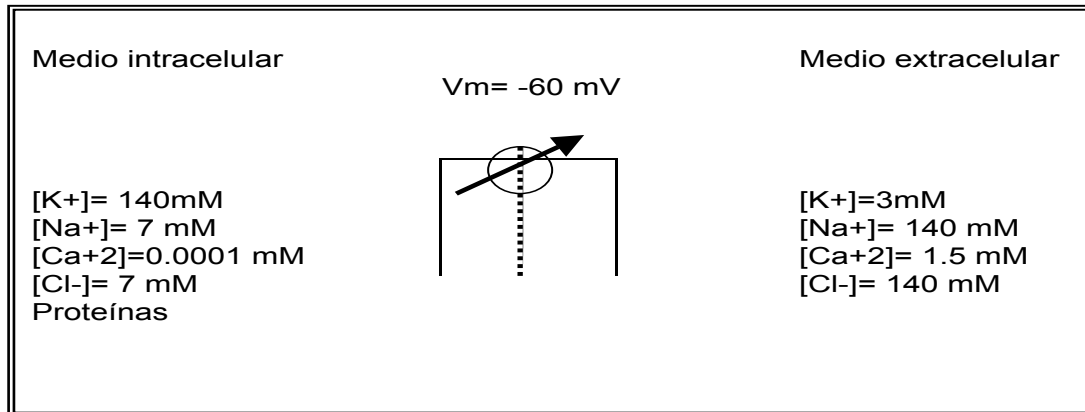
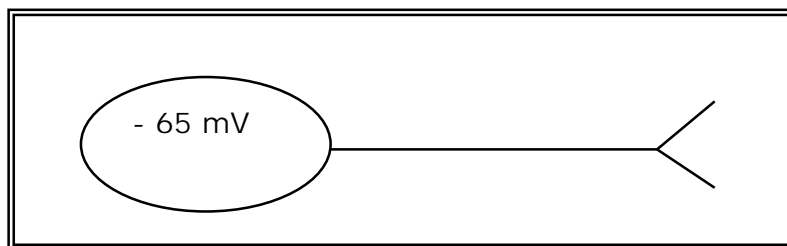


Figura 1.6. Extraído de “Cellular and molecular neurobiology” ²⁴.

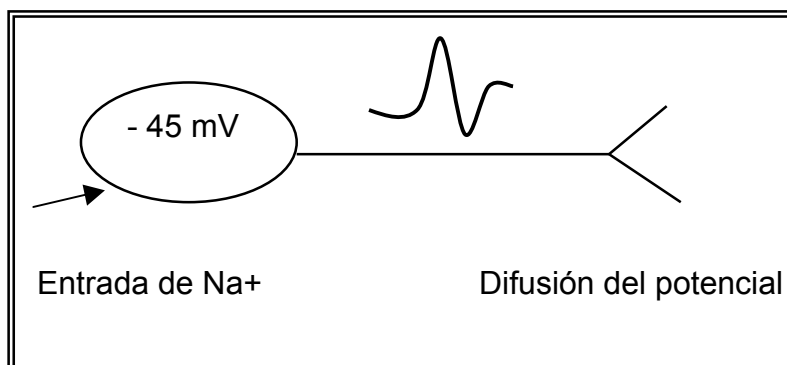
En principio una membrana en reposo presenta un potencial de -65 mV en el soma, debido a la existencia de la bomba Na^+/K^+ , que mueve tres iones sodio hacia el exterior de la célula por cada dos iones potasio hacia el interior ^{1, 15}.

Los estadios en los que se puede encontrar una neurona son ¹⁵:

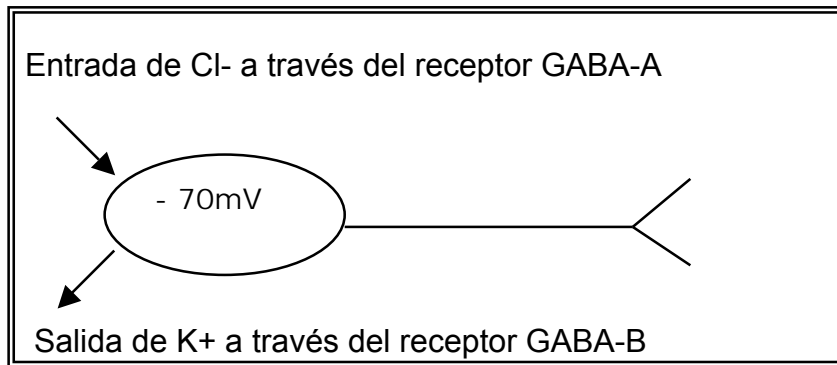
- **Reposo:**



- **Excitada:** Generación de un potencial de acción



- **Inhibida:** No generación de un potencial de acción



Los canales por los cuales se mueven los iones, son proteínas tridimensionales que atraviesan la bi-capa lipídica y que se abren por diversos motivos, según sea su naturaleza²⁴:

- Canales de voltaje: Se abren cuando se produce un cambio en el potencial de la membrana.
- Canales de ligando, de receptor o ionotrópicos: Se abren por la unión de un ligando externo como un neurotransmisor.
- Cuando se abren por la unión de un ligando interno como Ca^{+2} o un nucleótido cíclico.
- Cuando se abren por un estímulo mecánico como son los mecano-receptores.

El gradiente electro-químico de un determinado ión, determina la dirección de la difusión pasiva de ese ión a través del canal abierto²⁴:

1. Gradiente químico es aquel que tiende a igualar las concentraciones a ambos lados de la membrana.
2. Gradiente eléctrico es el que tiende a atraer cargas diferentes e igualarlas.
3. El potencial de equilibrio de un ión es el valor del potencial de membrana donde la fuerza de la concentración que tiende a mover los iones en una dirección se equilibra con la fuerza eléctrica que tiende a mover al ión en dirección contraria, es decir el potencial de membrana en el cual el flujo del ión

por un canal abierto sería igual a 0.

Este proceso se rige según la Ecuación de Nerst^{1, 23}:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i} = \frac{RT}{zF} \times 2,3 \log 10 \frac{C_e}{C_i}$$

donde:

R: Constante del gas ideal : 8.314 VCK-1 mol-1

T: Temperatura absoluta en grados Kelvin

F: Constante de Faraday (96.500 Cmol⁻¹)

Z: Valencia del ión

Ce: Concentración del ión externa

Ci: Concentración del ión interna

En el caso del cloro se puede calcular el potencial de equilibrio y el resultado es de ECl= -58 mV²⁴.

En el caso del potasio se puede calcular el potencial de equilibrio y el resultado es EK= -75mV¹.

Esta ecuación significa que si se abren los canales de Cl⁻, este entrará en la célula por un gradiente de concentración hasta llegar a un potencial de membrana de -58 mV, llegados a este punto los iones cloro tendrán las mismas posibilidades de entrar que de salir y por lo tanto el flujo neto sería cero²⁴. Teniendo en cuenta que el potencial de reposo es de -65 mV, la apertura de los canales de Cl⁻ tiende a mantener el potencial de membrana muy negativo o incluso en un valor hiperpolarizado, haciendo más difícil la despolarización de la membrana y por lo tanto haciendo más difícil que la célula se excite^{1, 23}.

Cuando el GABA es liberado a la brecha sináptica y se une al receptor da lugar a un flujo de Cl^- hacia el interior de la célula. La estructura del receptor GABA-A es un canal de Cl^- que al abrirse produce una hiperpolarización de la membrana post-sináptica. El GABA también puede unirse a un segundo tipo de receptor denominado GABA-B que actúa a través de canales de K^+ y/o de segundos mensajeros^{1, 24}.

La apertura de los canales de Cl^- crea un flujo hacia el interior de la célula hasta igualar concentraciones, y este aumento de concentración intracelular es el responsable del aumento del número de cargas negativas y por lo tanto de la hiperpolarización de la membrana post-sináptica, esto hace que la neurona no dispare un potencial de acción y por lo tanto el efecto final de la liberación del neurotransmisor GABA es una contribución a la inhibición del potencial de acción en la neurona post-sináptica²⁴.

1.4 Sinapsis GABAérgicas

El GABA es el neurotransmisor inhibitorio más importante del SNC de mamíferos¹. Se encuentra prácticamente en todas las partes del cerebro que se han estudiado^{1, 10, 12, 24}. Ejerce una inhibición post-sináptica rápida – dura milisegundos - y potente y esta forma de inhibición es crítica para mantener y diseñar la comunicación neural. Así mismo el GABA puede poner en marcha una respuesta más lenta – de segundos de duración – metabotrópica que juega un papel muy importante en la regulación de la neurotransmisión²⁴.

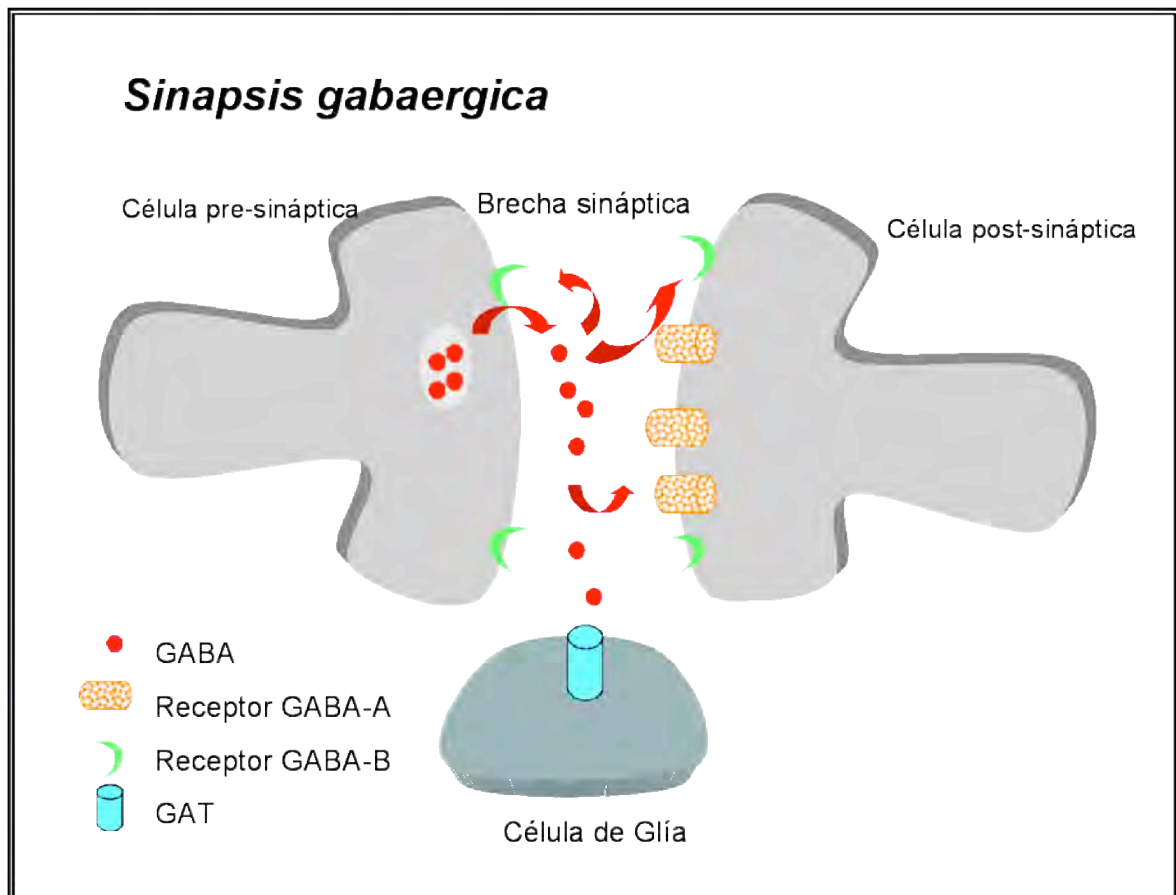


Figura 1.7

Cuando el GABA sale a la brecha sináptica hay varios tipos de receptores capaces de captarlo ⁶:

- Receptores GABA-A post-sinápticos
- Receptores GABA-B post-sinápticos
- Receptores GABA-B pre-sinápticos
- Transportadores gliales o neuronales para ser retirado por elementos pre-sinápticos o gliales.

Además existe la posibilidad de difusión de la brecha sináptica.

Una vez liberado el GABA tiene una vida media de milisegundos, ya sea porque la duración de la liberación es breve ó porque el GABA diluye su concentración en el espacio extracelular. Además como hemos visto antes, existe un ávido sistema de re-captación que recoge GABA de la brecha sináptica. Todos estos sistemas controlan con rigurosidad la concentración del GABA en la brecha sináptica ^{17, 24}.

La activación de los receptores GABA-A produce una rápida y sincronizada apertura de los canales de Cloro, provocando una rápida corriente post-sináptica inhibitoria^{1, 12}. Cada uno de los canales evoca un potencial, pero la corriente mediada por el GABA es la suma de las corrientes unitarias que van apareciendo con retrasos y duraciones variables. Todo esto es dependiente de los valores relativos del Potencial de membrana (V_m) y del potencial de inversión del cloro (E_{Cl})²⁴:

- Cuando E_{Cl} es más negativo que el V_m de reposo la activación del receptor GABA-A produce una hiperpolarización de la membrana post-sináptica y por tanto la inhibición de la actividad post-sináptica. Generándose un PPSI.

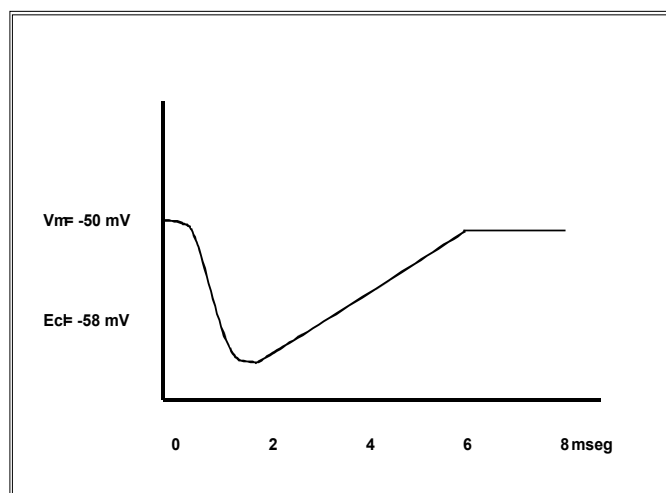


Figura 1.8

$E_{Cl} = -58 \text{ mV}$ frente a un valor $V_m = -50 \text{ mV}$

- Cuando E_{Cl} es cercano o igual al V_m de reposo, la activación del receptor GABA-A produce una “inhibición silenciosa” de la actividad postsináptica.

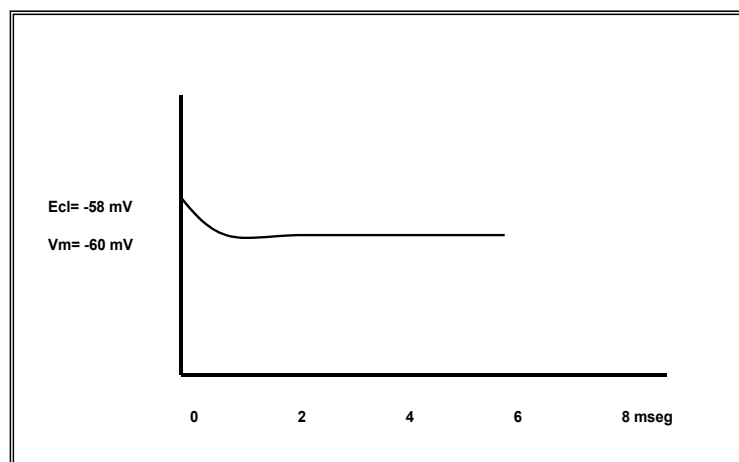


Figura 1.9

$E_{Cl} = -58\text{mV}$ frente a un valor $V_m = -60\text{ mV}$

- Cuando el E_{Cl} es mas positivo que el V_m , pero por debajo del nivel de generación de un potencial de acción a través de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, la activación del receptor GABA-A produce una corriente despolarizante pero inhibe la actividad post-sináptica.

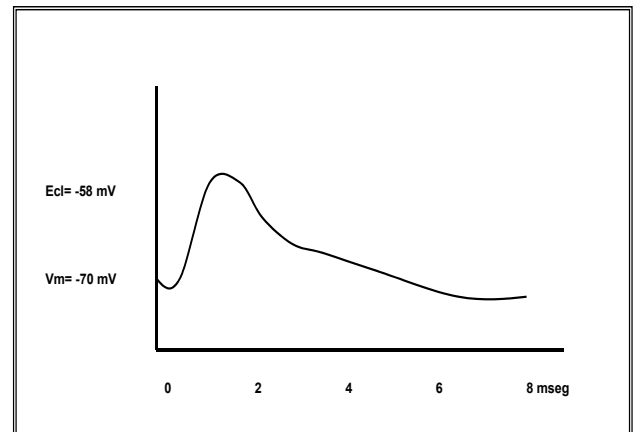


Figura1.10

$E_{Cl} = -58\text{ mV}$ frente a un valor $V_m = -70\text{ mV}$

Sin embargo cuando E_{Cl} es más positivo que el nivel de activación de los canales de Na^+ dependientes de voltaje, la activación del receptor GABA-A causa una despolarización post-sináptica o EPSP. Hay que poner de manifiesto que este efecto excitador teórico, del GABA nunca se ha descrito en sinapsis de adultos sino solo en procesos de desarrollo embrionario y postnatal temprano²⁵.

La activación de los receptores GABA-B inicia un proceso mediado por un segundo mensajero^{1, 8, 12} que es considerablemente mas lento. Debido al retraso inherente en las respuestas ligadas a un segundo mensajero, el GABA ha desaparecido de la brecha sináptica antes de que la respuesta mediada por los receptores GABA-B comience a actuar. Esta actividad ocurre a dos niveles: A nivel pre-sináptico con la inhibición de la liberación del neurotransmisor; a nivel post-sináptico con la hiperpolarización de la membrana postsináptica²⁴.

Los receptores GABA-B son más sensibles al GABA que los receptores GABA-A, y en estudios de curvas dosis-respuesta se observa que:

GABA-A EC50= 25 μ M

GABA-B EC50= 1,6 μ M

Probablemente esta mayor afinidad sea debida a diferentes factores, como la ubicación sináptica y las coordenadas temporales de actuación²⁴.

Las neuronas que participan en sinapsis GABAérgicas, también se denominan células o neuronas GABAérgicas, y se encuentran repartidas por todo el encéfalo^{1, 15} estudio que veremos con mas detalle en el apartado sobre la distribución del GABA en cerebro de rata adulta.

Las neuronas GABAérgicas en corteza, son células no-piramidales¹, son de tipo granular o estrelladas, que actúan como interneuronas ^{1, 15}, pero en general podemos decir que son una población de células muy heterogéneas, tanto a nivel morfológico, como por otras características como el perfil molecular; los intentos de clasificar las interneuronas corticales han fracasado por falta de consenso²⁶ Estas neuronas representan entre un 15-25% de la población cortical, frente al 75-85% de la población cortical de células piramidales que son glutaminérgicas, es decir utilizan el ácido Glutámico como neurotransmisor²⁷. Las neuronas GABAérgicas son lisas y están repartidas por todas las capas ejerciendo su función inhibitoria, son mas numerosas en las cortezas sensoriales y asociativas y no tanto en las cortezas motoras, lo cual sugiere un alto grado de procesamiento intra-cortical de la entrada sensorial ¹⁵.

A nivel de microscopía electrónica se observa que son simétricas – frente a las excitadoras glutaminérgicas que son asimétricas²⁷ – con una densidad post-sináptica muy delgada. Otros trabajos denominan a las sinapsis GABAérgicas de corteza cerebral de rata, sinápsis Gray tipo 2 ²⁸.

1.5. Acido Glutámico descarboxilasa – GAD.

La enzima de síntesis del GABA se denomina GAD o Acido Glutámico descarboxilasa^{1,6}. Esta enzima cataliza la reacción que transforma el ácido Glutámico en GABA usando como cofactor el piridoxal fosfato^{1,6,8}. La denominación de la enzima es (GAD; EC 4.1.1.15)¹⁷.

Esta enzima tiene un origen filogenético antiguo, su gen ha sido clonado en un organismo eucariota simple como *Neurospora crassa*, y también aparece muy temprano en el desarrollo embrionario, como veremos mas adelante²⁹, parece que la filogenia y ontogenia de esta enzima tienen puntos comunes.

En el cerebro de mamíferos adultos existen dos formas de la GAD con diferente peso molecular dato que se utiliza para nombrarlas^{17,29}. Basados en su movilidad electroforética se observan unos productos de peso molecular aproximado de 63kDa y otro de 59kDa³⁰. Estas dos proteínas son producto de genes diferentes: un gen –GAD67- esta localizado en el cromosoma 2 y codifica para una proteína de 67kDa; un segundo gen localizado en el cromosoma 10, codifica para una proteína de 65kDa³¹. Estas dos proteínas difieren en su secuencia, peso molecular, su distribución subcelular y en las interacciones con el cofactor piridoxal fosfato³². La enzima GAD65 tiene un peso molecular de 65KD y una secuencia de 585 aminoácidos¹⁷. El segundo producto génico se denomina GAD67 y tiene un peso molecular de 67KD y una secuencia de 593 aminoácidos¹⁷. Aunque difieren en la secuencia³², estas dos proteínas presentan una homología del 65%¹⁷-70%²⁹, siendo diferente la zona N-terminal¹⁷.

En el mRNA de GAD67 existen al menos tres posibles procesamientos alternativos, dos de los cuales se caracterizan por inserciones de 80bp (EP10) y 86bp (E15PCR), que presentan diferentes localizaciones de los codones de inicio y de parada, lo cual hace pensar que no codifiquen para proteínas completamente funcionales²⁹.

Las dos enzimas difieren en su localización subcelular, aunque en animales adultos las dos isoformas se localizan en el soma y las terminales; GAD65 esta localizada fundamentalmente en las vesículas de membrana es decir en terminales sinápticas y GAD67 es soluble y esta distribuida fundamentalmente por el citoplasma³³. Parece por tanto que GAD65 es critica para la síntesis de GABA que se utilizará en la transmisión sináptica²⁹.

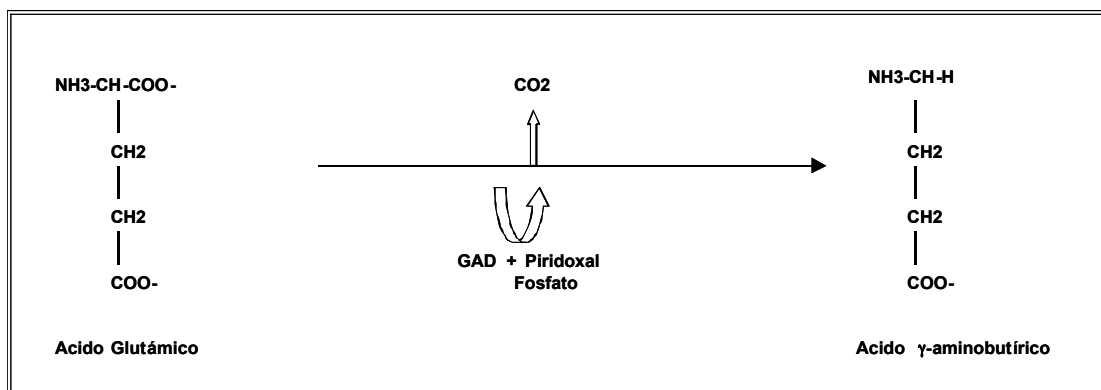


Figura1.11. Extraído y modificado de “Elements of molecular Neurobiology”⁸.

La presencia de la GAD en cerebro de rata, se ha estudiado fundamentalmente en individuos adultos, donde aparece un patrón de concentración bastante homogéneo en las distintas áreas y según diferentes autores¹⁷. Pero cuando se estudia a lo largo del desarrollo embrionario, se observa que su presencia no es constante, es decir hay zonas, como la medula espinal de la rata, donde su presencia es transitoria²⁹. Esta variación afecta tanto a su distribución anatómica, como a su patrón temporal, e incluso a la concentración durante el periodo de maduración, actuando probablemente como elemento de control y/o variabilidad del sistema GABAérgico^{34, 35}.

Hay estudios que ponen de manifiesto que la aparición temprana de transcritos de la familia GAD coincide con la aparición del GABA, con la aparición de mRNAs del receptor GABA-A y con la aparición de receptores GABA-A funcionales, en la medula espinal de rata embrionaria²⁹.

Así mismo a nivel celular, la enzima de síntesis presenta un patrón de distribución variable: primero aparece localizada en el pericarion y en las dendritas y posteriormente en los axones y en las varicosidades axónicas³⁶. Aunque el lugar natural de localización de la enzima GAD sea la fase citosólica de las terminales GABAérgicas⁸.

El incremento mas rápido de GAD, a nivel general, tiene lugar durante la segunda semana de vida postnatal, es decir entre PND7 y PND15 (Postnatal day, en siglas en ingles PND), coincidiendo con un rápido incremento en la densidad de varicosidades axónicas GAD+ inmunoreactivas. Este hecho es previo, en varios días, a la fase de rápida formación de sinapsis GABAérgicas³⁶.

Otros estudios en cambio detectan un incremento funcional de hasta 10 veces en los primeros días de vida es decir PND1 hasta PND5³⁷ y un declive paulatino de la actividad de la GAD entre el PND28 y PND 60³⁷.

La distribución de la enzima GAD es casi tan amplia como el GABA¹⁷ y se puede encontrar en lugares tan dispares como: las diferentes láminas de la médula espinal³⁸ y/o las células de la retina³⁹. En muchas ocasiones se ha utilizado la enzima de síntesis GAD para localizar el GABA en S.N.C.^{8, 10, 12, 17}, ya que solapan en su distribución.

En este trabajo estudiaremos la distribución del GABA en rata adulta y las diferentes técnicas que se han utilizado para localizarlo, entre ellas la localización de la enzima de síntesis – GAD-.

Posteriormente, cuando tratemos el tema de los receptores, comprobaremos que la farmacología del GABA ha sido ampliamente estudiada por las diversas aplicaciones clínicas en humanos: el control de la ansiedad y el control de las convulsiones epilépticas, entre otras. El fármaco alilglicina bloquea la GAD y así impide la síntesis del neurotransmisor².

1.6 Receptores del GABA

Una molécula como el GABA que ejerce su cometido, comunicando una célula pre-sináptica con otra célula post-sináptica, requiere del concurso de otras moléculas para poder ejercer su función. Las relaciones e interacciones macromoleculares que tienen lugar fundamentalmente a nivel de las membranas pre y post sinápticas se realizan gracias a los denominados receptores del GABA.

Hasta el momento se han descrito 3 tipos fundamentales de receptores del GABA¹⁷:

- Receptor GABA-A
- Receptor GABA-B
- Receptor GABA-C

Existen varias revisiones exhaustivas sobre estos receptores^{24, 40} aunque en este apartado de la introducción solo haremos una exposición general que nos permita comprender mejor el papel del GABA en el S.N.C. de rata.

1.6.1 Historia

El estudio del “comportamiento humano”, ha sido un tema que clásicamente ha apasionado a los científicos. Una de las características fundamentales del S.N.C. humano es el hecho de poder pensar sobre su propia estructura y funcionamiento cerebral⁴¹. De las muchas manifestaciones del comportamiento, algunas emociones básicas como el miedo y la ansiedad y sus vertientes patológicas, han sido las que han primado, tanto desde la perspectiva funcional o comportamental como desde la perspectiva genética, bioquímica, molecular, citológica y de circuitos neurales, así como su localización anatómica³.

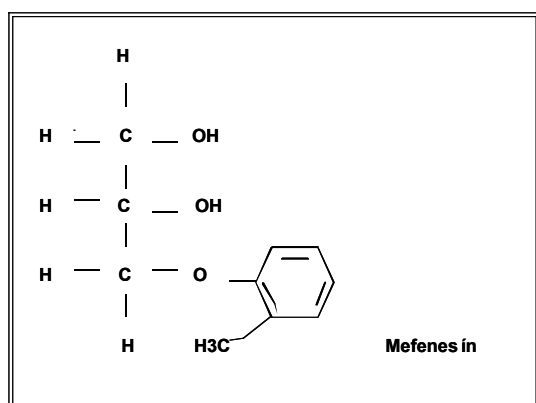
“El miedo” ha sido, una potente herramienta evolutiva para la supervivencia del individuo y de la especie^{3, 42}, enviando señales sobre situaciones o

acontecimientos que suponían un peligro, disparando el sistema límbico de “lucha o huida”, el eje neuroendocrino hipotalámico-hipofisiario-suprarrenal⁴². Pero a su vez el miedo se ha convertido en un arma de doble filo, ya que si un determinado nivel de alerta es bueno para la supervivencia, el exceso le convierte en un proceso patológico que puede impedir el devenir normal de la vida⁴³. Por otra parte, si el miedo es una herramienta de supervivencia individual y de la especie, puede que esté íntimamente ligado a otros procesos como los de memoria y aprendizaje, tanto a nivel funcional, como desde el punto de vista anatómico: sistema límbico: amígdala e hipocampo⁴⁴.

En humanos, los desordenes de ansiedad son los trastornos psiquiátricos mas frecuentes, estando presentes entre 10-30% de la población en general⁴⁵. Los psiquiatras definen la ansiedad como la respuesta biológica, en ausencia del estímulo apropiado, frente a la respuesta biológica adaptativa que aparece cuando existe una amenaza real para la vida del individuo o la progenie. En estos casos se dispara la respuesta de “lucha o huida” con todo el dispositivo neuroendocrino: una intensa actividad del sistema nervioso simpático, su componente fisiológico - segregación de adrenalina y cortisol, alteración del latido cardiaco, de la tasa y el volumen respiratorio, la transpiración y la tasa metabólica muscular -. La duración de la crisis simpática puede variar entre los 10 y 30 minutos, siendo también variable la frecuencia con la que se presentan estas “crisis de ansiedad”. La primera descripción sobre estas crisis de ansiedad que encontramos en la literatura se remonta 1860 y fue realizado por un medico militar describiendo los síntomas de algunos soldados, y lo denominó como el “síndrome de corazón irritable y en honor al médico que lo describió recibió el nombre de síndrome de DaCosta”⁴⁶. Ha sido el estudio del miedo y de la ansiedad, el que ha hecho posible el descubrimiento de los receptores de GABA^{46, 42}.

El tratamiento mas común⁴⁷, a lo largo de la historia, para los trastornos de la conducta humana ha sido el farmacológico¹², y en el trastorno de la ansiedad se comenzó a trabajar hace ya mucho tiempo, para encontrar drogas que permitieran reducir los síntomas y se les ha denominado ansiolíticos¹².

El primer paso en el desarrollo de este tipo de drogas se dio al inicio de la década de los cuarenta, cuando el farmacólogo F. Berger que trabajaba en el campo de los antibióticos, buscado alternativas para cepas resistentes a las penicilinas, encontró un grupo de sustancias que parecían prometedoras y comenzó los estudios con animales de experimentación⁴⁶. Inyectaba a ratones las sustancias y observaba que quedaban paralizados durante un tiempo, al parecer por un relajamiento general de la musculatura de las extremidades. Un aspecto destacable en el estado de los ratones es que permanecían totalmente despiertos y atentos a su entorno. Berger pensó que estos fármacos podrían ser de interés para enfermedades de tipo muscular y así el “*mefenesin*” – uno de los relajantes que Berger usó con los ratones- comenzó a aplicarse en humanos. Y resultó ser un eficaz relajante muscular y como tal se sigue usando en nuestros días⁴⁶.



Animado por los resultados obtenidos, Berger buscó derivados de esta molécula que potenciaran los efectos tranquilizadores que sugerían los pacientes a los que se les había administrado.

Figura 1.12. Estructura de la molécula del mefenesin⁴⁶

Descubrió un derivado que denominó “*meprobamato*” y que tenía un mayor efecto tranquilizador en animales de experimentación, incluidos monos de laboratorio.

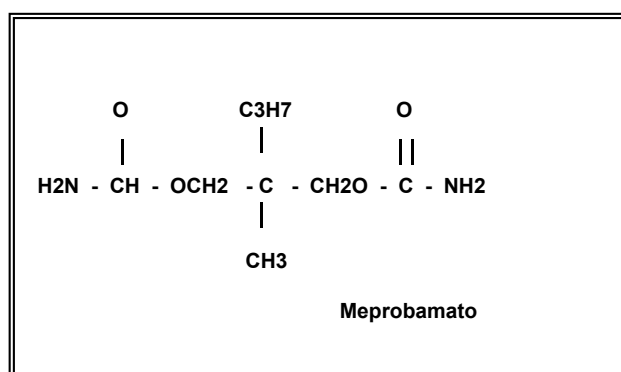
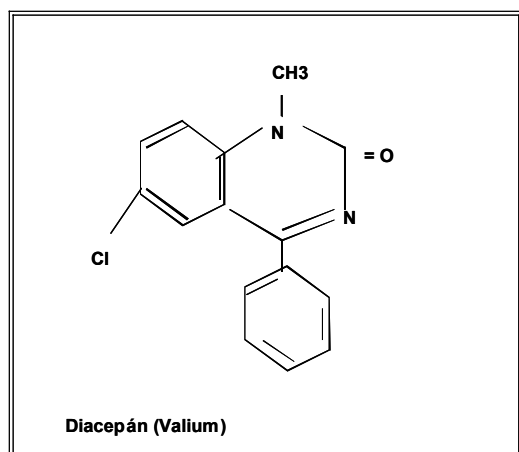


Figura 1.13. Estructura de la molécula de meprobamato⁴⁶.

Aunque estudios posteriores no confirmaron las expectativas iniciales de este fármaco, si logró cambiar la mentalidad reinante en la época y asentó la idea de poder influir selectivamente sobre la ansiedad.

Varios laboratorios comenzaron a buscar de forma específica fármacos ansiolíticos¹². El químico Leo Sternbach de los laboratorios Roche, sintetizó el *Librium* y el *Valium*, pertenecientes a una familia denominada benzodiazepinas. En 1963 se introdujo en clínica el uso del *Valium*, demostrándose su efecto ansiolítico y de relajante muscular, aunque también produce cierta somnolencia, pero esta se supera en las primeras semanas de tratamiento. Otra de sus características es que genera cierto grado de adicción: con su uso continuado se adquiere tolerancia y cuando se para bruscamente el tratamiento se presenta el síndrome de abstinencia².



La familia de las benzodiazepinas además potencia los efectos depresivos del alcohol y de los barbitúricos y por tanto su combinación puede ser letal y a lo largo de la historia reciente muchas muertes han sido atribuidas a su combinación.

Figura 1.14. Estructura de la molécula de diazepam⁴⁶.

Pero, ¿cómo actúan las benzodiazepinas? La actividad selectiva sobre la ansiedad de este grupo de compuestos estuvo claro desde el principio, de forma que los investigadores confiaban que estudiando sus mecanismos moleculares responsables llegarían a saber como el cerebro regula la ansiedad. A principio de los años sesenta se averiguó que las benzodiazepinas, el meprobamato y los barbitúricos afectaban todos a un mismo tipo de transmisión sináptica. Para ello se realizaron estudios de tolerancia cruzada y de dependencia cruzada. A continuación se estudiaron las interacciones de estas drogas y de determinados

neurotransmisores. Los estudios que mas éxito obtuvieron eran aquellos que se relacionaban con el GABA, en neurotransmisor inhibidor que nos ocupa. El GABA al unirse a su receptor disminuye la frecuencia de disparo de la neurona y se observó que los efectos inhibidores del GABA eran potenciados por el alcohol, los barbitúricos, el meprobamato y las benzodiacepinas⁴⁶.

En 1977 se descubrió –por dos grupos de trabajo independientes– la existencia en el cerebro de receptores especiales para las benzodiacepinas, usando las mismas técnicas que se habían usado para la identificación de los receptores de los péptidos opiáceos años antes.

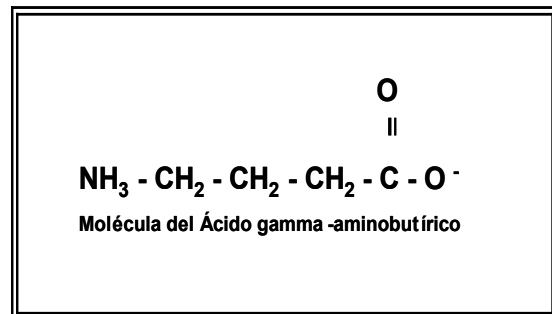


Figura 1.15. Estructura de la molécula de GABA¹.

Se incubó Valium radiactivo con membranas cerebrales y se comprobó que se adhería de forma muy firme y selectiva. Estudios con otras benzodiacepinas pusieron de manifiesto la correlación que existía entre la fuerza de unión a las membranas con su potencia ansiolítica en humanos⁴⁶.

La siguiente pregunta lógica era: "sí los humanos no nacen con Valium en sus organismo ¿qué hacen los receptores de las benzodiacepinas en nuestro cerebro?". En los estudios iniciales se analizaron numerosos neurotransmisores pero no lograron identificar a ninguno.

John Tallamn en 1978⁴⁸ descubrió que el GABA tenía un efecto sorprendente sobre esos sitios de unión: en lugar de competir con el Valium radioactivo que se unía a las membranas, el GABA estimulaba la unión de la droga a los receptores de benzodiacepina. Otros autores examinaron directamente los receptores del GABA y hallaron que el Valium estimulaba la unión del GABA a los receptores del GABA. El dato era que cada uno estimulaba la unión del otro a su receptor, lo cual indicaba que en vez de unirse ambos en el mismo sitio, el GABA y el Valium se

unían a lugares que debían guardar una estrecha relación y que se influían mutuamente. Los estudios posteriores han venido a demostrar que ambos receptores se alojan en la misma macromolécula proteica. Otros trabajos, también han permitido localizar un tercer lugar de unión que corresponde a los sedantes y anti-convulsionantes como el fenobarbital – barbitúrico ampliamente usado para controlar la epilepsia -.

Finalmente Eric Barnard en 1987⁴⁹ logró aislar los receptores GABA-Benzodiacepina-sedante-convulsionante del resto de los componentes de la membrana cerebral, en una única molécula proteica sensible a los iones cloro y como es de esperar la proteína consta de numerosas subunidades.

1.6.2. Receptor GABA-A

Cuando en 1967 Krnjevic y Schwartz ²⁴ observaron que si se aplicaba GABA sobre un tejido nervioso se producía una hiperpolarización de la membrana neuronal, comenzaron un camino que terminaría en 1987 con la primera purificación de las proteínas que forman parte del receptor GABA-A⁴⁹. Ello llevó a enunciar la hipótesis de que el GABA mediaba la transmisión sináptica inhibitoria del S.N.C. de adultos ⁷.

Las primeras sub-unidades se lograron aislar en geles de poliacrilamida, con la aparición de 2 bandas, lo cual hizo sospechar la existencia de sub-unidades. Estas bandas se denominaron “ α ” la de peso molecular de 53KD y “ β ” la de peso molecular de 56KD. Pero la confirmación de la heterogeneidad del receptor vino dada por la clonación del cDNA de las diferentes sub-unidades: α ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) y de β ($\beta 1$ - $\beta 3$) conocidas hasta el momento⁵⁰.

Con posterioridad, se observó que había hasta 5 tipos sub-unidades α , β , γ , δ y ρ ⁸, cada sub-unidad con un tamaño aproximado de entre 450-550 aminoácidos, donde hay una homología del 30-40% en su secuencia de aminoácidos y que se encuentra muy conservada entre las diversas especies.

Actualmente se han clonado para el S.N.C. de mamíferos las siguientes productos génicos²⁴:

- 6 tipos de subunidades α
- tipos de subunidades β
- 1 tipo de subunidad γ
- 1 tipo de subunidad δ
- 1 tipo de subunidad ε
- 1 tipo de subunidad π
- tipos de subunidades ρ

Como vemos el receptor GABA-A es una familia de al menos 16 sub-unidades diferentes, que están codificadas por distintos genes y que muestran un patrón de expresión diferente dependiendo de la edad del sujeto⁵¹ y de la localización, en el sistema nervioso⁵². De hecho hay estudios que ponen de manifiesto que cada sub-unidad presenta un patrón de expresión temporo-espacial único, que puede influir en el desarrollo de diversas estructuras cerebrales como la corteza⁵⁰. Hay autores que han trabajado en cerebelo, proponiéndolo como modelo para el estudio de la diversidad del receptor GABA-A^{53, 54, 55}.

Por otro lado se han aislado siempre pentámeros⁴⁰ – 5 subunidades – y para que sean funcionales, como receptores del GABA, tiene que haber como mínimo una subunidad α , otra β y otra γ . En células intactas es común ver la combinación α 1/2 β 2/3 γ ²⁴. Las diversas sub-unidades se ensamblan en forma de pentámeros de composición variable⁵³.

Finalmente la estructura propuesta para el receptor GABA-A⁸ esta basada en la información disponible actualmente; cada sub-unidad se sabe que presenta:

- Un dominio N-terminal hidrofílico, expuesto a la brecha sináptica extracelular.

- 4 segmentos hidrofóbicos denominados M-1, M-2, M-3 y M-4, cada uno de ellos formado por 20 aa aproximadamente, que serían los posibles segmentos de trans-membrana, con una estructura en α -hélice.
- El segmento M-2 de cada sub-unidad del receptor GABA-A, parece ser el implicado en el canal y contribuye a la selección del ión así como de su transporte. Habría un pequeño número de aminoácidos de la secuencia de M-2 responsable de la permeabilidad de aniones frente a la de cationes.
- Esta estructura es compatible con un canal.

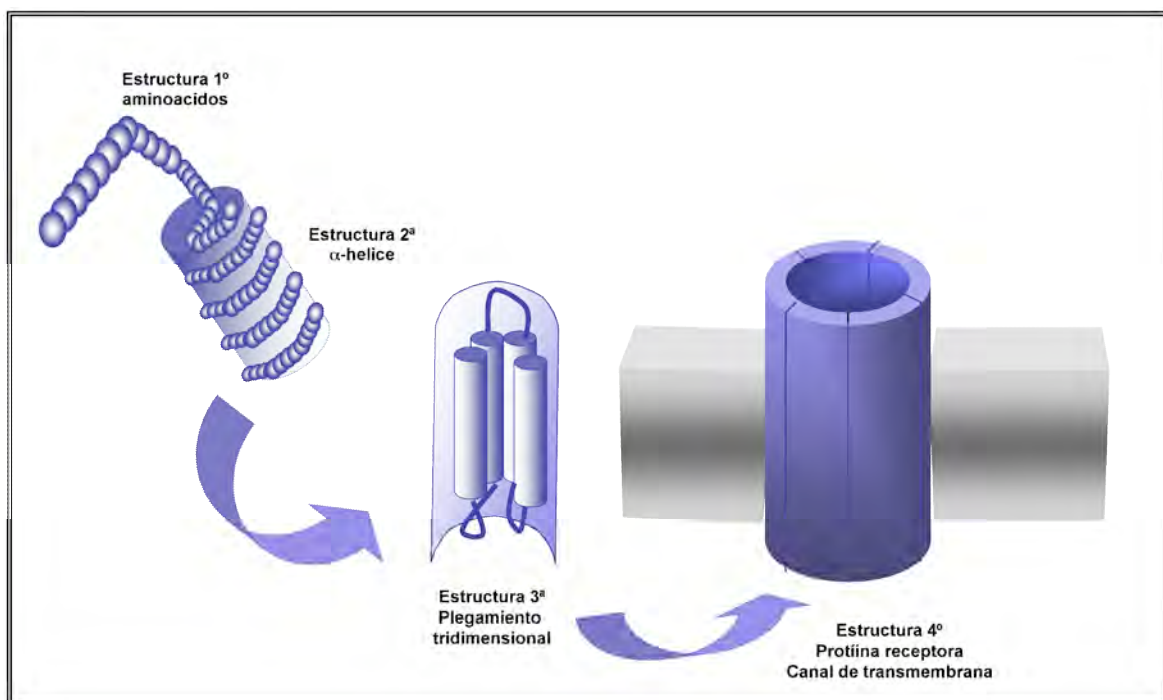


Figura 1. 16. Modelo propuesto para el receptor GABA-A

Con toda esta información disponible, se ha propuesto una estructura para el receptor GABA-A que consiste en 5 sub-unidades colocadas alrededor de un poro central⁸, como se sabe que el diámetro del canal no puede ser mayor de 5,6 Å en su punto mas estrecho, es geoméricamente imposible empaquetar de otra manera las α -hélices de las 5 sub-unidades.

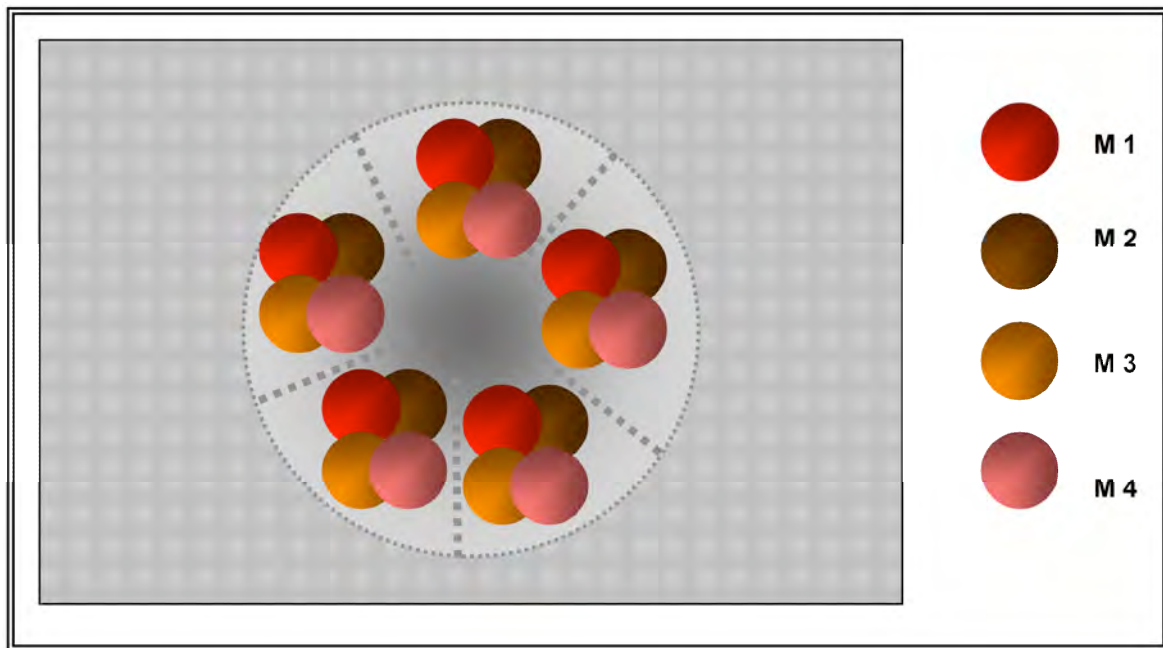


Figura 1. 17. Modelo propuesto para el receptor GABA-A, visión superior, con poro central⁸.

La farmacología del receptor GABA-A ha sido una de las mas intensamente estudiadas en los últimos años, en un intento de encontrar dianas mas selectivas y especificas para las drogas o fármacos en tratamiento de humanos.

El receptor del GABA-A tiene varios dominios funcionales identificados², aunque no todos están localizados estructuralmente:

- Lugar de unión del GABA
- Lugar de unión de las benzodiazepinas
- Lugar de unión de los barbitúricos
- Lugar de unión de los esteroides
- Lugar de unión de la picrotoxina

El lugar de unión del GABA no se conoce claramente aunque se ha estudiado intensamente⁴⁰, ya que parece que todas las sub-unidades podrían hacerlo, pero

es la sub-unidad α la que presenta una mayor afinidad¹. Existen sustancias que hacen aumentar o disminuir la corriente generada por el GABA de forma reversible, son los denominados agonistas o antagonistas^{1,56}. Estas sustancias pueden ser un antagonista competitivo como la **bicuculina**⁵⁷ de origen natural, o como el **muscimol**⁴⁰, desarrollado tomando como modelo la propia molécula del GABA que actúa como agonista.

El lugar de unión de las benzodiazepinas ha sido el más intensamente estudiado¹, cuando se investigaban los fármacos ansiolíticos. Estas sustancias reducen la ansiedad, promueven el sueño, actúan como relajantes musculares y disminuyen la actividad convulsiva en humanos. Existen pruebas de que el cerebro produce una sustancia que sería el ligando endógeno natural del lugar de unión de las benzodiazepinas: la metil- β -carbolina-3-carboxilato^{2,6}, que actúa como un agonista inverso, siendo sus efectos conductuales un aumento del miedo, la tensión y la ansiedad, justo lo contrario que las benzodiazepinas. Algunos autores apoyan la idea de que la β -CCM y otros neuro-moduladores son liberados en momentos de peligro y aumentarían la motivación del animal para ejecutar conductas que le permitan escapar o defenderse. Pero queda mucho por responder sobre los ligandos endógenos de todas estas moléculas. El lugar de unión de las benzodiazepinas parecía estar situado en la sub-unidad γ ^{40,1}, pero estudios posteriores han puesto de manifiesto que realmente es en la zona de transición entre α y γ ², y que podría haber secuencias de aminoácidos o zonas de M-1 y M-2 que actúen como potenciadores de esa unión.

Parece ser que el lugar de unión de los barbitúricos, al receptor GABA-A, son las sub-unidades α y β ¹, aunque otros autores se inclinan por dejar el interrogante abierto²⁴, sobre el lugar exacto.

La comprensión del lugar de unión de los esteroides, se debe a los estudios realizados sobre anestésicos generales, en los cuales producen un efecto sedante aunque de nuevo, el lugar exacto de acción sobre el receptor, es desconocido². En concentraciones clínicas los agentes anestésicos incrementan cerca de un

50% la corriente de Cloro inducida por el GABA y parece ser que los receptores GABA-A son el blanco principal de la mayor parte de los anestésicos generales¹². A nivel molecular esto ha supuesto un gran cambio de mentalidad en la comunidad científica, ya que se pensaba que estos esteroides interactuaban con la bicapa lipídica y ahora se sabe que lo hacen con una proteína de membrana como es el receptor GABA¹².

Tanto las benzodiacepinas como los barbitúricos o los neuroesteroides potencian de forma reversible la corriente generada por los receptores GABA-A, siendo agonistas alostéricos del receptor GABA-A^{1,24}.

La picrotoxina es una sustancia venenosa se encuentra en las semillas de un arbusto de las Indias Orientales denominado *Anamirta cocculus*, que a dosis altas produce convulsiones^{2,40} es el antagonista no-competitivo del receptor GABA-A^{1,24}.

Finalmente, el mecanismo de funcionamiento del receptor GABA-A pasa por la unión de dos moléculas de GABA, lo cual produce un cambio conformacional²⁴ del receptor, que le lleva a adquirir el estado de abierto. En estudios con curvas dosis-respuesta indican que la estequiometría es de dos moléculas de GABA por receptor, para lograr que el canal se abra, llegándose a un modelo:

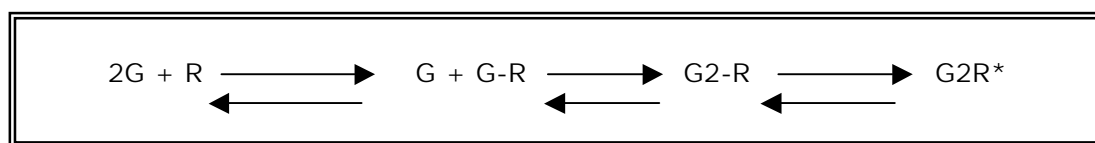


Figura1.18. Modelo propuesto de activación del receptor GABA-A²⁴.

Siendo:

G: GABA

R: Receptor

GR o G₂R: Configuración cerrada del receptor con mono o bi-ligando

G₂R*: Configuración abierta del receptor con dos ligandos unidos.

Se ha estudiado por mutagénesis, cuales son los aminoácidos concretos que permiten la activación del canal por el GABA y están localizados en la subunidad β : Tirosina 157, treonina 160, treonina 202 y tirosina 206²⁴.

El receptor GABA-A es un canal que es selectivamente permeable a iones de Cloro⁴⁰, como ya hemos visto anteriormente. Se ha medido el potencial de inversión de una corriente de GABA y se observa que varía con el potencial de equilibrio del Cloro $-E_{Cl}$. Así mismo en condiciones fisiológica intra y extracelulares normales, la corriente del GABA registrada en neuronas espinales aisladas, se invierte a -60 mV²⁴. (Para mas detalles ver el apartado sobre el entorno iónico del Cloro, de esta introducción)

El receptor GABA-A es un canal de cloro, que se abre y permite la entrada de estos iones, pero ¿cuáles son las características de esta apertura?²⁴. Se observan dos tipos de aperturas del canal:

- Breves aperturas, con un tiempo medio (τ_o) de 2,5 msg y que se piensa que contribuyen poco al total de la corriente.
- Ráfagas o salvas de aperturas. Se define una ráfaga como una secuencia de aperturas cada una de ellas con un tiempo medio de apertura, separadas por un periodo de cierre. Podríamos expresarlo de la siguiente manera:

τ_o = Tiempo de apertura de breve duración, es decir al menos 5 msg el canal abierto

τ_c = Tiempo con el canal cerrado o de silencio, donde la corriente es cero

τ_b = Tiempo de ráfaga = $\sum \tau_o + \sum \tau_c = 20-50$ msg

El receptor GABA-A es un receptor que se desensibiliza, es decir hay una caída en la respuesta del receptor al aumentar la concentración de GABA, en un proceso de inhibición por concentración de ligando. Al aumentar la concentración de GABA en el medio, de la activación de larga duración que se había producido

en el receptor, en el estadio de doble ligando abierto, se pasaría a una situación de doble ligando desensibilizado y cerrado²⁴.

Resumiendo, podemos decir que el receptor GABA-A es un canal de cloro que cuando se le une el neurotransmisor GABA, genera en la neurona post-sináptica un IPSP. Además puesto que el receptor presenta unas amplias posibilidades de expresión de diferentes sub-unidades a lo largo del desarrollo y de la vida adulta, así como en las diferentes ubicaciones en sistema nervioso. Todo ello le convierte en un actor privilegiado en el proceso de organización neurológica y de funcionamiento cerebral

1.6.3. Receptores GABA-B

El intenso estudio de los receptores del GABA-A, llevó a definir un segundo tipo de receptor que se denominó GABA-B. El grupo de Hill y Bowery⁵⁸ estaba trabajando con un agonista del GABA –*el baclofen*– que administrado por vía oral, cruzaba la barrera hematoencefálica, pero que no actuaba sobre los receptores conocidos previamente como GABA-A. El trabajo había comenzado en los años 70 y el estudio de este fármaco permitió ver que reproducía algunas de las funciones del GABA como disminuir el tono muscular e inhibir la actividad refleja de la médula espinal, aunque también presentaba algunas diferencias como por ejemplo la insensibilidad al antagonista clásico del GABA, la bicuculina²⁴. Finalmente el trabajo publicado por este grupo reconoció la existencia de un segundo tipo de receptores. Así además del receptor GABA-A que es un canal de Cloro, es decir de naturaleza ionotrópica, el receptor GABA-B es de tipo metabotrópico^{2, 17, 24, 40}, es decir actúa por medio de un segundo mensajero¹.

El estudio de los receptores GABA-B ha permitido ver que para que sean completamente funcionales, requieren del acoplamiento de dos productos génicos; denominados GABA-BR1 y GABA-BR2⁵⁹, siendo el receptor GABA-B el primer ejemplo de un heterodímero funcional metabotrópico²⁴.

En 1997¹⁷ se clonaron con éxito el GABA-BR1 y se encontraron 2 isoformas la R1a y la R1b. Su secuencia indicó que no existían similitudes con la secuencia de los receptores GABA-A o GABA-C, pero si con la familia 3 de proteínas G-acopladas¹, las proteínas G, son aquellas que ligan nucleótidos Guanidil. Esta familia incluye miembros como los receptores metabotrópicos del glutámico^{6,17}, receptores sensibles a Ca²⁺, receptores de feromonas y receptores gustativos. Esta familia posee algunas características comunes muy interesantes²⁴:

- Extremos N-terminales de gran tamaño, expuestos extra-celularmente que juegan un papel importante en la unión al ligando.
- Siete dominios de trans-membrana
- Un primer bucle intracelular de tamaño corto y muy conservado y con un papel crítico en la activación de la proteína G.
- Un segundo bucle intracelular que resulta clave para el acoplamiento selectivo de la proteína G.
- Un extremo carboxi-terminal que es el mas variable y que es la diana de interacciones con múltiples proteínas.
- Las proteínas G presentan 3 sub-unidades: α , β , γ .

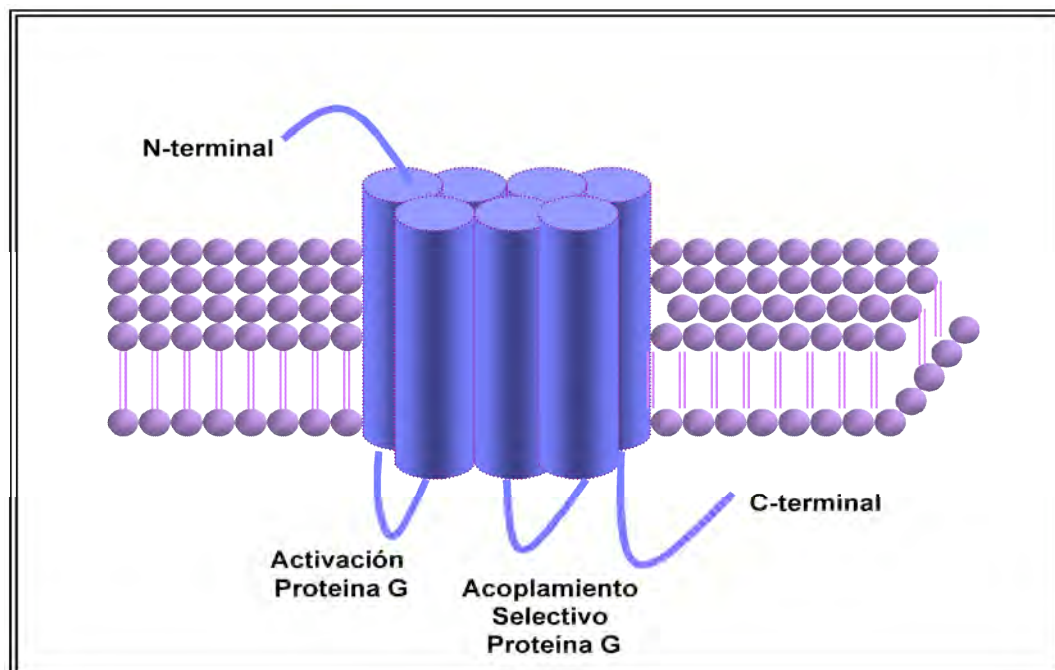
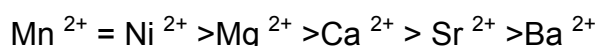


Figura 1.19. Modelo propuesto del receptor GABA-B

La subunidad del receptor R-1 tiene identificadas hasta ahora 4 isoformas identificadas²⁴ siendo las primeras conocidas, como hemos dicho anteriormente, R-1a de 130KD y R-1b de 100kD y que presentan un alto grado de similitud⁶⁰. La tercera denominada R-1c, se genera por la inserción de 31 aminoácidos entre el 2º bucle extracelular y la 5ª región de trans-membrana de un GABA-B R-1a o de un GABA-B R-1b. La última en ser identificada se ha designado como GABA-B R-1d y es idéntica a GABA-BR-1b, pero tiene una inserción de 566 pares de bases que produce una secuencia de aminoácidos diferente en la secuencia carboxiterminal²⁴.

Farmacológicamente los receptores GABA-B se diferencian de los receptores GABA-A por ser insensible a la bicuculina y por la activación selectiva con el blacofen^{2, 17, 24}. El blacofen es estereo-específico, es decir el isómero (-) es 100 veces más potente que el isómero (+)²⁴. El lugar de unión del agonista es sobre R-1, en dominio amino-terminal extracelular²⁴.

El receptor del GABA-B para unir el GABA requiere de la presencia de cationes divalentes – otra de las diferencias con el receptor GABA-A que no los necesita -. La potencia de la unión es como aparece a continuación:



La localización de los receptores GABA-B es tanto pre-sináptica – modulando la liberación del neurotransmisor¹⁷ – como post-sináptica – participando en la inhibición⁶¹ y en la liberación de neurotransmisores como L-glutámico, noradrenalina, dopamina, 5hidroxitriptamina, sustancia P, entre otras¹⁷.

La secuencia de pasos de este proceso sería la siguiente²⁴:

- Se libera el GABA
- El GABA se liga al receptor GABA-B
- El receptor GABA-B sufre un cambio conformacional
- Este cambio potencia la unión de la proteína G

- A su vez la unión de la proteína G potencia la afinidad del receptor por su agonista, el GABA.
- La unión de la proteína G al receptor cataliza el cambio de GDP a GTP en la sub-unidad α de la proteína G.
- Esto provoca la disociación de la proteína G del receptor, el cual vuelve a su estado de baja afinidad.
- La proteína G a su vez se disocia en la sub-unidad α y en las sub-unidades β y γ , que ahora están libres para actuar sobre varios efectores.
- La señal termina cuando la GTPasa endógena de la sub-unidad α convierte de nuevo el GTP en GDP.
- Esto provoca la disociación de la sub-unidad α del efector y la re-asociación con las sub-unidades β y γ .
- Esta unión con α , inhibe la interacción de β y γ con sus efectores.

Como hemos dicho anteriormente, los receptores GABA-B son proteínas G acopladas a diferentes mecanismos efectores^{24, 62}. Esquemáticamente:

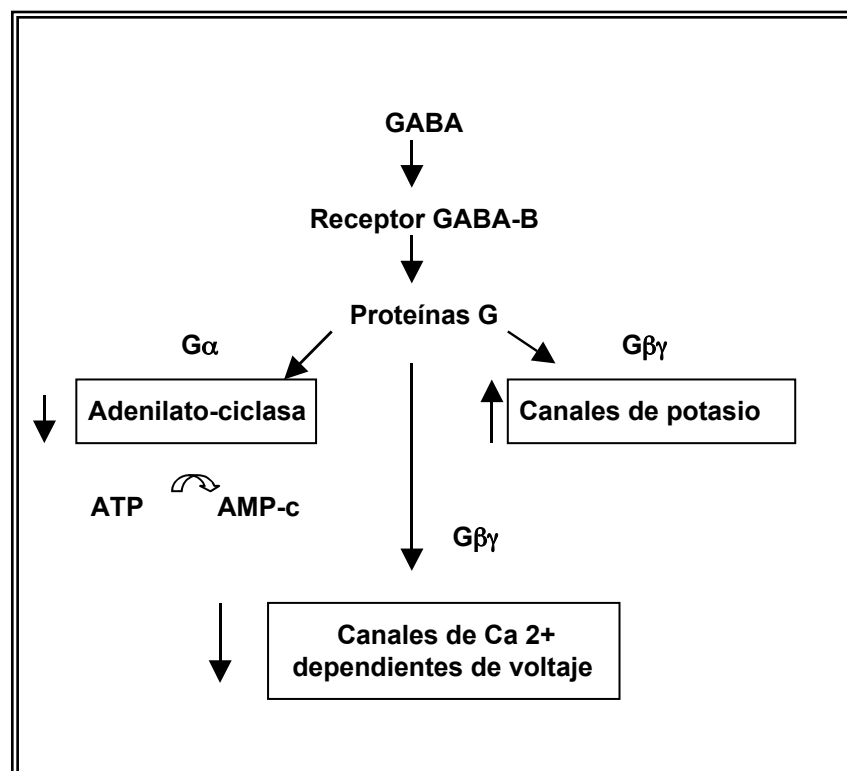


Figura 1.20. Modelo de actuación en cascada del receptor GABA-B²⁴

La adenilato ciclasa¹ enzima encargada de transformar el ATP en AMP-c²³, regula funciones celulares como la transcripción génica, el metabolismo celular y la plasticidad sináptica. El GABA, a través de sus receptores GABA-B y las proteínas G regulan la actividad de esta enzima, inhibiéndola a través de la sub-unidad α . Sin embargo las sub-unidades β y γ pueden favorecer la acumulación de AMP-c, actuando sobre otros miembros de la familia de las adenilato-ciclasa (Tipos I a IX). Por lo tanto el GABA actúa sobre el equilibrio entre la estimulación / inhibición del AMP-c²⁴.

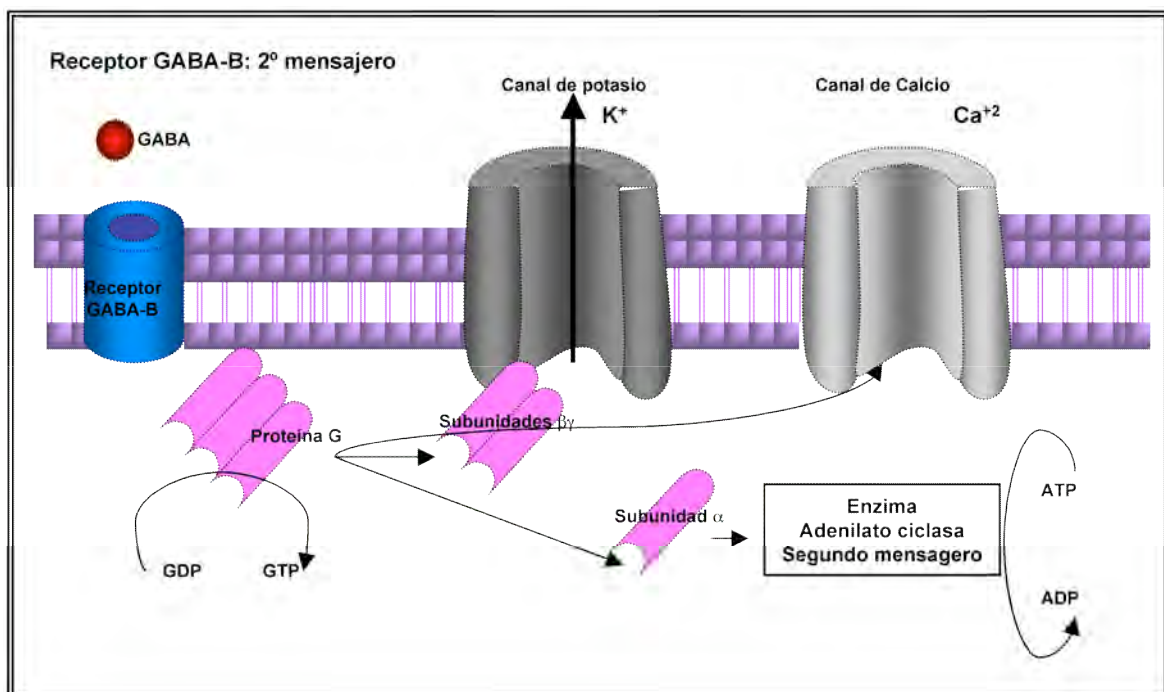


Figura 1.21. Esquema de actuación del receptor GABA-B

La activación de los receptores GABA-B inhibe los canales de calcio dependientes de voltaje⁴⁰. Estos canales que son los grandes controladores de la entrada de Ca^{2+} en la neurona²³, y se activan por despolarización de la membrana neuronal. La función última de este proceso es la generación de potenciales de acción así como la trasducción de la señal y la liberación del neurotransmisor. La inhibición de los canales de Ca^{2+} depende de las proteínas G, a través de la interacción directa de las sub-unidades β y γ con el canal de

calcio. Esto no hace disminuir el número de canales de calcio funcionales sino alterando su dependencia del voltaje²⁴.

Los receptores GABA-B activan los canales de K⁺¹⁷. Los canales de potasio –denominados Kir –, acoplados a las proteínas G lo hacen a través de las subunidades β y γ . Se produce un cambio en la conductancia de los canales de potasio, ya que la salida del potasio genera una gran hiperpolarización en la membrana que estaba en reposo, generando un IPSP^{15, 63}.

Continuando con el trabajo que habían iniciado en 1987 cuando describieron la existencia de este segundo tipo de receptor, Bowery et al⁶⁴ estudiaron la distribución en SNC de rata del receptor GABA-B; observando que esta presente en todas las áreas cerebrales estudiadas, pero en general existe una predominancia de los receptores GABA-A frente a los receptores GABA-B. Las regiones cerebrales que poseen la mas alta densidad de receptores GABA-B son los núcleos talámicos, la capa molecular del cerebelo, la corteza cerebral, el núcleo interpeduncular y la lámina II y III de la médula espinal. Los receptores GABA-B están ampliamente distribuidos por todo el sistema meso-cortico-límbico⁶². Hay, sin embargo, algunas excepciones, donde el receptor GABA-B es mas abundante que el receptor GABA-A, como son la capa molecular del cerebelo y el núcleo interpeduncular del mesencéfalo⁴⁰. Otros estudios posteriores han observado que el receptor GABA-B puede llegar a ser el 90% del total de los lugares de unión al GABA, en zonas como el tronco del encéfalo y algunos núcleos talámicos²⁴.

El receptor GABA-B al igual que el receptor GABA-A, presenta una expresión diferencial a lo largo del desarrollo embrionario⁶¹ y postnatal⁶⁵. El mRNA del receptor GABA-B se detecta por primera vez en el tubo neural en ED-11⁶⁶, de los dos productos génicos conocidos BR1 y BR2, existe una mayor expresión de BR1 que de BR2, que se mantiene hasta ED-17 cuando se estudia en el bulbo olfativo y el estriado, pero que se equilibra en el animal adulto excepto en las capas celulares granulares y glomerulares del bulbo olfativo y en el estriado⁶⁶. Así

mismo BR1 se detecta en ED-11,5 en medula espinal y neuroepitelio de corteza cerebral⁶⁷, en ED-12,5 ya se encuentra en hipocampo y en los neuroepitelios de corteza cerebral, intermedio, posterior y pontino, sin que estos días se detecte BR-2^{67, 68}. Durante este periodo del desarrollo el patrón de expresión del mRNA para BR1, es máximo entre ED-15,5 y 19,9 frente a la patrón de BR2 que va desde 15,5 hasta 21,5⁶⁹. Aunque BR2 ya se detecta en pequeñas cantidades en neocortex en ED-14⁶¹, expresándose los dos subtipos en el estrato cortical, pero también en la zona marginal y el sub-estrato⁶¹. En ED-18 se detectan BR1a, BR1b y BR2 en la sustancia gris de la medula espinal⁷¹. En el hipocampo los receptores GABA-B se distribuyen ampliamente durante el desarrollo y tanto el B1 Como B2 están presentes pre y post sinapticamente⁷⁰. En el desarrollo postnatal tanto BR1 como BR2 se distribuyen en la corteza de ratas en células piramidales, estando ausentes de las células Cajal-Retzius de la capa I⁶¹. Además en la medula espinal de rata postnatal en PND-2, hay un descenso general pero ahora se concentra en las motoneuronas del asta ventral⁷¹. En general podemos decir que en medula espinal de rata Br1a se mantiene constante durante el desarrollo, BRb1, va aumentando desde PND-2 hasta llegar a los niveles del adulto, mientras que BR2, decrece desde PND-2 hasta el nivel del adulto⁷¹.

Debido a esta expresión temporal y espacial variable, a este receptor se le han atribuido otras funciones como son: tróficas en la sinaptogénesis⁷¹, señalización para la migración de neuronas embrionarias⁷², potenciación a largo plazo de las sinapsis⁷³. Concretamente el receptor GABA-B pasa por un proceso de regulación dinámica durante el desarrollo del cerebelo, asociado con el establecimiento y maduración de las sinápsis glutaminérgicas de las células de Purkinje⁷⁴. Todas estas expresiones diferenciales espacio-temporales, le convierten en una pieza clave del sistema gabaérgico, así como en la organización neurológica del SNC del animal adulto, como opinan numerosas autores^{69, 75}.

1.6.4. Receptores GABA-C

Como hemos señalado anteriormente, la liberación del GABA, activa tres tipos de receptores¹⁷, uno de los cuales es el receptor GABA-C. Los receptores GABA-C también son ionotrópicos, pero con diferentes características que los receptores GABA-A, a nivel farmacológico. Algunos autores los consideran como un subtipo de los receptores GABA-A²⁴. Pero el receptor GABA-C presenta unas características diferenciales de GABA-A, ya que no tiene la misma respuesta a la **bicuculina**¹⁷, de hecho el receptor GABA-C es insensible a las drogas que modulan la actividad de los receptores GABA-A y GABA-B, y son activados selectivamente por el ácido cis-4-aminoacrotónico¹⁷. Pero claramente producen corrientes de Cl⁻⁴⁰. El receptor GABA-C es mas sensible al GABA que el receptor GABA-A¹⁷. Los receptores GABA-C expresan la sub-unidad ρ ⁷⁶ y las sub-unidades ρ , no aparecen con frecuencia, esto llevó a algunos autores a clasificar a los receptores GABA-C, como una especialización de los receptores GABA-A²⁴.

Este, parece ser un receptor de la ruta visual, ya que en la retina se han detectado las sub-unidades ρ -rho1, rho2, rho3⁷⁷- que se expresan en los bastones⁴⁰, aunque también ha aparecido en colículo superior, lo cual puede parecer que este implicado específicamente con el procesamiento del movimiento a nivel de campos visuales⁷⁸.

En estudios mas recientes se ha detectado la sub-unidad ρ 2 en otras áreas del S.N.C. como el hipocampo y la corteza²⁴, así como ρ 1 en el soma y las dendritas de las células de Purkinje⁷⁷.

Los receptores ionotrópicos GABA-C producen corrientes de Cloro que son insensibles a la bicuculina y tienen una expresión diferencial en el periodo embrionario y postnatal frente al cerebro del adulto⁷⁶, tal y como se ha estudiado a través de la expresión del mRNA en diferentes áreas cerebrales como las células de Purkinje del cerebelo o el hipocampo⁷⁹.

1.7. Otras funciones del GABA

Además de su papel como neurotransmisor inhibitor en el cerebro adulto de mamíferos y de excitador durante el desarrollo, al GABA se le han asignado otras funciones, especialmente en el periodo embrionario y postnatal temprano, antes de llegar a la edad adulta. Estas funciones podrían resumirse:

- Papel neurotrófico y promotor de la migración
- Protector
- Modelador de circuitos: Osciladores
- Promotor de la sinaptogénesis
- Otros

Papel neurotrófico y promotor de la migración.

Durante el desarrollo del SNC, los neuroblastos proliferan en las zonas germinales del neuroepitelio y migran hacia sus posiciones finales fundamentalmente a través de las fibras de la glía radial, pero además gracias a factores ambientales que condicionan el movimiento de las células y las moléculas que forman la matriz extracelular que son las mas firmes candidatas a realizar esta labor junto con diversos factores de crecimiento. Pero el GABA también ejerce efectos tróficos sobre las neuronas inmaduras⁸⁰, como ocurre en células embrionarias de médula espinal en ED-13, donde el GABA y NGF se co-localizan en fibras cercanas a las dianas de destino de la neuronas que migran. Así mismo el GABA en la medula espinal puede favorecer el desarrollo neuronal, regulando el pH neuronal en los estadios tempranos del desarrollo⁸¹.

También se ha observado que muchas células embrionarias de la medula espinal de rata expresan de forma transitoria formas de bajo peso molecular de la enzima de síntesis – GAD –, pero estas células no expresan GABA, solo aquellas que logran síntesis y procesamiento de la enzima GAD 67, una de las isoformas de la enzima como veíamos en la introducción, logran expresar el GABA, pero

distribuido de forma difusa por el citoplasma, ya que este no se detecta en sinaptosomas hasta el nacimiento, todas estas circunstancias hacen sospechar en un papel trófico o metabólico durante el periodo de desarrollo embrionario⁸².

Así mismo se ha observado en células del tronco del encéfalo obtenidas de ED-14, que expresan fenotipos monoaminérgicos, serotonina-positivas y noradrenalina-positivas, presentan receptores del GABA-A, que median los efectos tróficos del GABA⁸³.

Esto también ocurre en neuronas corticales embrionarias, cuando deben migrar desde la zona ventricular hacia el estrato cortical y el GABA estimula la motilidad celular. El GABA puede actuar a diferentes concentraciones: concentraciones de GABA femtomolar provoca quimio-taxis - movilidad a lo largo de un gradiente químico - y el GABA a concentraciones micromolares provoca quimio-cinesis - aumento de movimientos al azar -⁸⁴.

En este papel asignado al GABA como promotor de la migración, parece estar implicado en la estructuración de la corteza cerebral en capas. La reelina es una proteína que presenta algunas similitudes con otras proteínas constituyentes de la matriz extracelular, esta implicada en el desarrollo de estructuras laminares en la corteza. Existe un porcentaje de entre el 50-60% de neuronas GABAérgicas que expresan reelina, segregándola a los espacios peri-neuronales⁸⁵. Se ha observado que en cultivos donde esta presente la laminina, esta favorece la diferenciación de las neuronas del neuroepitelio e incrementa la proliferación de las células GABAérgicas⁸⁶. Algunos autores han propuesto que el propio GABA actúa como factor trófico del desarrollo neural de forma auto-limitante, al depender la actividad GABAérgica de los niveles de mRNA de los transportadores de potasio y cloro -KCC2-, cuyos niveles son decisivos en el cambio de función del GABA de despolarizante a hiperpolarizante⁸⁷.

También se ha observado que el GABA produce incrementos en los niveles de Ca²⁺ intracelular en zonas ventriculares, en parte a través de la activación de

canales de calcio dependientes de voltaje; puede actuar haciendo descender el número de células embrionarias corticales que sintetizan DNA. Todos estos datos han llevado a estos autores a enunciar un nuevo papel para el GABA como regulador de la neurogenesis neocortical⁸⁸.

Protector.

La parvalbumina es una proteína que liga calcio y co-existe con el GABA en las ínter neuronas inhibitorias corticales, del hipocampo y las células de Purkinje en cerebelo, pero solo aparece en fases postnatales, con un desfase de 1 o 2 semanas con respecto a la inmunoreactividad al GABA, y parece que la expresión de la parvalbumina está subordinada a la actividad fisiológica de estos circuitos⁸⁹. Se ha comprobado que el GABA favorece la supervivencia pero no la proliferación de ínter-neuronas parvalbumina-inmunoreactivas en el neoestriado, aunque parece que también puede promover la migración de subpoblaciones de estas ínter-neuronas⁹⁰.

Como se ha observado en numerosas ocasiones el ácido glutámico y el GABA actúan remodelando circuitos neurales, en concreto se ha observado que el GABA en hipocampo de rata, previene la regresión dendrítica inducida por el ácido glutámico⁹⁷.

A nivel más general podríamos decir que en los procesos de excitotoxicidad, cuando se presenta una situación de hiperactividad por una sobreactivación de los receptores de glutámico, el GABA puede impedir en un primer momento que se desencadene la cascada de sucesos que llevarán finalmente a la muerte célula⁹⁷; aunque queda mucho por conocer de los procesos moleculares implicados algunos aspectos se van conociendo, siendo clave para la protección celular el equilibrio entre excitación e inhibición.

Modelador de circuitos: Osciladores.

La actividad oscilatoria sincrónica de circuitos corticales inmaduros puede estar dirigida por neuronas GABAérgicas del sub-estrato⁹⁷, lo que sugiere una función integradora que sincroniza la actividad neuronal, de todas las señales de entrada tanto intrínsecas como extrínsecas que se redistribuyen a través de todo el estrato cortical en desarrollo.

Promotor de la sinaptogénesis.

El cono de crecimiento es el responsable de la elongación axonal y de encontrar el camino hacia la diana, a través de la respuesta que va dando a diversos factores que actúan como moduladores del crecimiento neurítico y parece que el GABA y su receptor GABA-A actúan a este nivel favoreciendo la sinaptogénesis⁹¹. Las interacciones entre los neurotransmisores regulan el crecimiento neurítico en células hipocámpicas en desarrollo y se ha observado que el GABA actúa como promotor de la sinaptogénesis y del crecimiento⁹⁷.

Miscelanea.

Entre todas las funciones que le han sido asignadas al GABA, están aquellas que le relacionan con las células de glía, con la que como ya hemos ido mencionando, mantiene una estrecha colaboración. Se ha observado que la señalización GABAérgica media en la organización morfológica de los astrocitos en el telencéfalo de rata adulta⁹². Además se ha comprobado que el GABA podría presentar acciones excitadoras después de una agresión o trauma neuronal⁹³.

1.8. El neurotransmisor GABA en el cerebro de la rata adulta.

1.8.1. Coordenadas temporales.

La distribución del GABA en el S.N.C. de rata puede estudiarse en diversas coordenadas temporales. Se pueden diferenciar tres grandes periodos, en relación con la presencia de poblaciones neuronales GABAérgicas:

- Periodo embrionario
- Periodo postnatal
- Periodo adulto

El periodo o etapa embrionaria. Este periodo va desde el momento de la concepción hasta el final de la gestación de la rata⁹⁴. Normalmente se denomina por sus siglas en ingles “Embryonic Day” ED como hemos visto anteriormente, y dura 22 días, datándose los fetos como ED-1 hasta ED-22. La aparición del GABA a lo largo de este periodo temporal y las coordenadas espaciales en las que tiene lugar son el objeto de nuestro trabajo y lo expondremos en el apartado correspondiente resultados.

Periodo o etapa postnatal. Este periodo se denomina en la literatura en general, por sus siglas en ingles “Post-Natal Day” PND y su duración es variable, como veremos en el capítulo dedicado a desarrollo postnatal. El GABA sufre cambios y transformaciones a lo largo del desarrollo. Existen zonas donde hay una presencia transitoria de GABA antes de alcanzar los niveles del adulto o puede llegar a desaparecer. Los cambios que sufre el GABA a lo largo del desarrollo se consideran un reflejo de la maduración de los circuitos cerebrales o de la intensa sinaptogénesis y mielinización que se produce durante este periodo⁹⁵.

Debemos tener en cuenta que en el periodo embrionario todo el proceso está mediado fundamentalmente por variables de tipo genético y por la situación fisiológica en que se encuentra la madre gestante; pero en este periodo postnatal

además de las variables genéticas debemos tener en cuenta la interacción del sistema nervioso con el entorno, como motor de las modificaciones de circuitos por la estimulación o la ausencia de la misma⁹⁶. Esta selección funcional de unos circuitos frente a otros tiene consecuencias importantes en los niveles de neurotransmisores⁹⁷. Los resultados del estudio del GABA en los periodos embrionarios y postnatal los expondremos en el capítulo de resultados de la tesis.

Periodo o etapa adulta. Una vez alcanzado el final del desarrollo, el GABA llega a una distribución y una concentración que se mantiene constante hasta el final de la vida¹.

En este apartado de la introducción, haremos un resumen del conocimiento actual sobre la distribución del GABA en el cerebro de rata adulta. El neurotransmisor GABA ha sido ampliamente estudiado en los últimos treinta años, y en todos los manuales de Neurociencia existen uno o varios capítulos dedicados a este tema^{1, 10, 17}.

1.8.2. Distribución del neurotransmisor GABA en el cerebro de rata adulta

El neurotransmisor GABA se detectó por primera vez en tejido cerebral de animales adultos en 1950¹⁰, posteriormente en 1967 se observó que aplicando GABA se producía una hiperpolarización de la membrana neuronal¹⁰ y esto llevó a enunciar la hipótesis de que el GABA mediaba en la transmisión sináptica inhibitoria del S.N.C. de adulto. Finalmente en 1973 se aceptó el GABA como neurotransmisor inhibitor, al cumplimentar todos los criterios dados para una sustancia transmisora⁷. A lo largo del tiempo estas neuronas que utilizan GABA como neurotransmisor han sido denominadas “neuronas GABAérgicas”.

La localización del GABA en el S.N.C. de animales adultos se ha realizado fundamentalmente por tres métodos, sobre los cuales los diversos autores muestran su acuerdo y son¹⁰:

- Inmunohistoquímica de la GAD - enzima de síntesis -.
- Inmunohistoquímica del GABA.
- Auto radiografía de GABA marcado radiactivamente.

Localización a través de la inmunohistoquímica de la Ácido Glutámico descarboxilasa o GAD.

A lo largo de los años todos los laboratorios que trabajan en el tema, han llegado al acuerdo generalizado, de que la localización de la enzima de síntesis GAD es un marcador fiable de la presencia de GABA en una célula, ya que se solapa en su distribución con la del neurotransmisor GABA¹⁷.

Debido al gran tamaño que presenta esta proteína enzimática – compuesta por las dos sub-unidades que veíamos anteriormente, la GAD65 y la GAD67¹⁷– una vez que el tejido ha sido fijado, rara vez puede salir fuera de la célula, salvo que esta fuera tratada con fuertes detergentes¹⁰.

En 1973, el grupo del Dr. E. Roberts, purificó la enzima GAD y produjo un antisuero específico en conejo, esto permitió visualizar por primera vez de forma inequívoca las células gábergicas¹⁰. Así mismo se constató que las neuronas que usan otros neurotransmisores no contienen cantidades de GAD que sean significativas o distinguibles del fondo, de igual forma las células de la glia no contiene GAD¹⁰.

Localización a través de la inmunohistoquímica del GABA.

También se han producido anticuerpos para el propio GABA, pero este proceso presenta dificultades técnicas, dado el tamaño de la molécula, ya que el GABA es muy pequeña. Los fijadores que contienen glutaldehído retienen el GABA en el tejido durante los procesos de preparación histológica¹⁰.

Localización a través de la autoradiografía del GABA marcado radiactivamente.

Esta técnica se descartó rápidamente como mecanismo de detección del GABA¹⁰, ya que la presencia de GABA no es exclusiva de las terminales presinápticas GABAérgicas. Como hemos visto anteriormente, en las sinapsis GABAérgicas hay implicadas varios tipos de células – neuronas pre-sinápticas que liberan GABA como neurotransmisor, neuronas post-sinápticas que presentan receptores de GABA en sus dendritas o cuerpos celulares, pero que a su vez pueden liberar en sus terminaciones axónicas otro tipo de neurotransmisor, o células de glía circundante que van a participar en el mantenimiento del entorno bioquímico con la captación de GABA de la brecha sináptica²⁴ – todas estas células pueden aparecer marcadas. Pero solo las células presinápticas que lo liberan como neurotransmisor son realmente células GABAérgicas.

Por lo tanto, existe el acuerdo de utilizar como marcador en el estudio de localización del GABA su enzima de síntesis GAD. Es decir, se considera que si una neurona contiene GAD demostrable inmunocitoquímicamente, esa neurona puede sintetizar GABA y usarlo como neurotransmisor^{7,10}. Últimamente se ha utilizado en la localización de GAD la identificación del mRNA que lo sintetiza y aunque los resultados en su mayoría son coincidentes existen algunas pequeñas diferencias¹⁷. En nuestro trabajo de localización de células GABAérgicas utilizaremos indistintamente tanto la inmunohistoquímica del GABA como GAD.

Además en corteza cerebral, muchas de las células que usan GABA como neurotransmisor, también pueden dar positivo para otro tipo de sustancias como son la Parvoalbumina (PV), la sustancia P y otros pépticos conocidos^{1,98,99}, usándose en ocasiones la co-localización⁶.

La localización de la enzima GAD a nivel subcelular es variable en función del tipo de célula que estemos estudiando - con o sin axón¹ – del área cerebral – médula frente a corteza, cerebelo frente a bulbo olfatorio¹⁰ – o del momento del desarrollo – animal postnatal o animal adulto¹⁰⁰-. Pero en general se localiza en los

vesículas de las terminales axónicas¹⁰ de las células GABAérgicas. En cuerpos celulares se localiza en aquellos tipos de células que no presentan prolongaciones como son las células granulares del bulbo olfativo¹⁰.

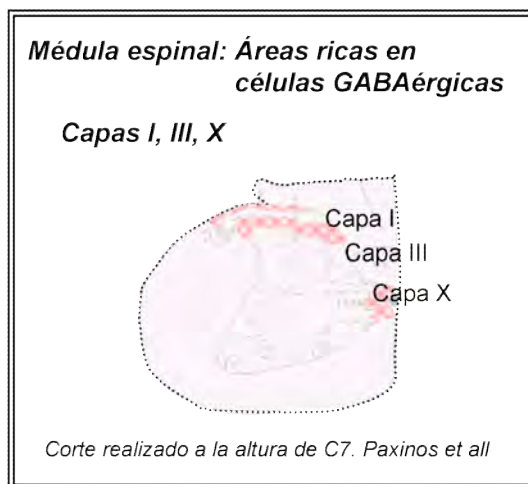
La tipología de las células GABAérgicas se ha estudiado intensamente, intentándose realizar clasificaciones¹ pero hay que atender a muchos tipos de variables como las características morfológicas de la células, de las prolongaciones, por sus conexiones sináptica aferentes o eferentes y si participan en circuitos locales o son células de proyección¹⁰. Y es que siendo el GABA el neurotransmisor inhibitorio mas ampliamente repartido por el sistema nervioso central de mamíferos^{1, 7, 10, 17, 24}, una clasificación tiene que ser compleja, por obligación. Cuantitativamente el “sistema GABA” es tan importante para los sistemas inhibitorios como lo es el “sistema glutámico” para los sistemas excitatorios^{1, 7, 10, 17, 24}. Mientras que las neuronas monoaminérgicas o colinérgicas, constituyen pequeñas poblaciones o núcleos de células similares, las neuronas GABAérgicas forman un sistema ampliamente distribuido^{1, 7, 10, 17, 24}. En algunas regiones presenta elevadas concentraciones, del orden de $\mu\text{moles/g}$ de tejido congelado, lo que representa aproximadamente 1000 veces la concentración de las monoaminas^{6, 107}.

Pero en general, podríamos decir que el GABA, es el neurotransmisor de células pequeñas (no-piramidales) que integran circuitos locales y que no presentan espinas dendríticas, es decir que son lisas¹. Abundan en regiones tales como corteza, bulbo olfativo, hipocampo, cerebelo, retina, entre otras^{1, 10, 107}. Existen excepciones a lo anteriormente dicho, como son las células de Purkinje que son neuronas de proyección que usan el GABA como NT, o los tractos de proyección que van desde el estriado a la sustancia negra¹⁰⁷.

Médula espinal

El GABA ha sido localizado en la medula espinal del cerebro de rata adulta¹⁷. La localización se ha realizado tanto con anticuerpo anti-GABA¹⁰¹ como con

anticuerpos anti-GAD¹⁰². Se detectan células GABA en todas las láminas de la sustancia gris espinal, desde la capa I hasta la capa X, excepto el pool de motoneuronas de la lámina IX⁵, pero presentan una mayor densidad en las capas I-III y en la capa X^{101, 5}, de hecho lo que se observa es un gradiente de tinción, que comienza siendo muy intenso en las capas I-III y que decrece ventralmente¹⁰¹. Los cuerpos celulares GAD(+) más pequeños –9 a 13 μm – se localizan en las capas I-III y el tamaño de los cuerpos celulares aumenta progresivamente hacia las laminas mas ventrales, alcanzando un tamaño máximo en la lamina VII donde el tamaño medio es de 12 a 19 μm ⁵.



Es interesante poner de manifiesto que en la capa X existen dos poblaciones de células morfológicamente diferentes – esféricas y elongadas – que son GAD(+) y que contactan con el líquido cefalorraquídeo⁵.

Figura 1.22^{121, 103}

Las células GABAérgicas de la medula son interneuronas¹⁰¹. Las capas mas superficiales, que son las que presentan una mayor densidad^{5, 101}, de células GABA, están implicadas en recibir, modular y transmitir impulsos de fibras aferentes primarias¹⁰¹, lo cual puede darnos una idea del papel que juega el GABA en modular la intensidad del estímulo ascendente.

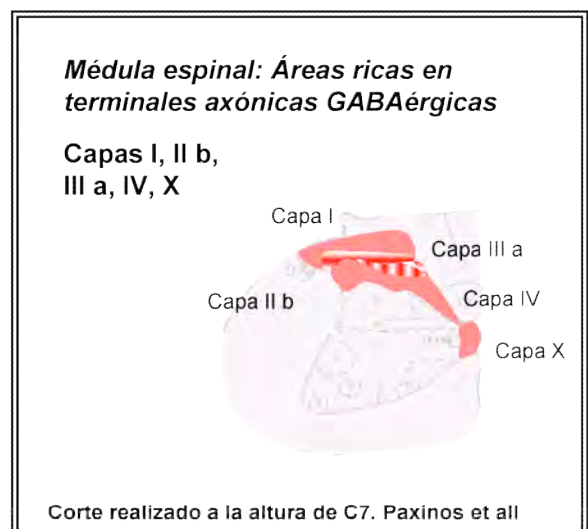


Figura 1.23¹²¹

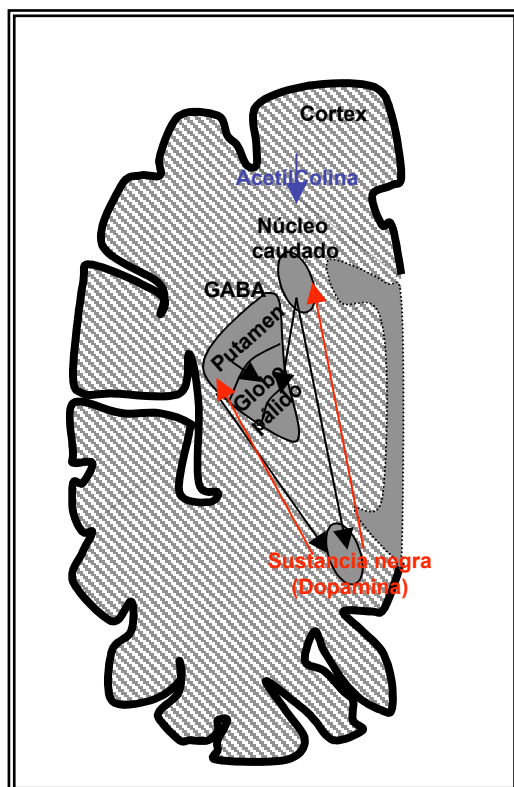
Especialmente de las vías espino-talámicas que transmiten temperatura y nocicepción, de las cuales las células GABA participan, siendo células que además presentan sustancia P¹⁰¹.

Núcleos del tronco del encéfalo

En el núcleo dorsal del rafe aparece una intensa tinción de células GABA inmunoreactivas, especialmente cerca del cuarto ventrículo¹⁰⁴ en el neuropilo de este núcleo, aunque parece que el número real de células productoras de GABA es escaso⁴⁰.

En el locus coeruleus, la enzima GAD está presente en las terminales que sinaptan sobre las dendritas y el cuerpo celular de las neuronas noradrenérgicas, estas células se originan en el núcleo del prepositus hipoglosa. Sin embargo no existe ninguna célula GABAérgica intrínseca en este núcleo⁴⁰.

Formación reticular



Las rutas de la formación reticular se han estudiado en función del NT que usan y se ha observado que la ruta GABAérgica⁵ surge en la parte reticulata de la sustancia negra y estas células GABAérgicas mandan sus axones a los componentes parvocelulares de la formación reticular, las cuales participan en el control de los músculos de la boca y de la región facial, el tectum del mesencéfalo y varios grupos de células del tálamo⁵.

Figura 1.24^{1, 15}.

Las neuronas GABAérgicas también se encuentran en el núcleo reticular magnocelular, proyectando estas neuronas a la médula espinal, y median en la pérdida de tono muscular que ocurre durante la fase del sueño REM⁵. En la sustancia negra el neuropilo nigral muestra una inmunoreactividad GAD muy intensa, especialmente en la parte pars-compacta, donde se observa que las células GAD-inmunopositivas, rodean completamente a las células no teñidas⁴⁰. En cambio en la pars-reticulata se encuentran muchas menos terminales GABAérgicas, siguiendo un patrón a parches⁴⁰.

Las sinapsis GABAérgicas constituyen la gran mayoría de las sinapsis de este área, cubriendo virtualmente todas las dendritas y el soma o cuerpo celular de las células nigrales – que son dopaminérgicas¹-, pero el origen de estas terminales GABAérgicas que sinaptan en la sustancia negra tiene su origen en células que están localizadas en el estriado, particularmente en la parte posterior¹, y el pálido⁴⁰ así como el caudado y el putamen⁵, como veremos posteriormente.

Cerebelo

El cerebelo constituye una estructura muy estudiada desde todos los puntos de vista, incluidos los neurotransmisores que intervienen en sus comunicaciones. Esta estructura específica de vertebrados está muy conservada evolutivamente⁵, y aunque solo representa un 10% del volumen total del cerebro, incluye mas de la mitad

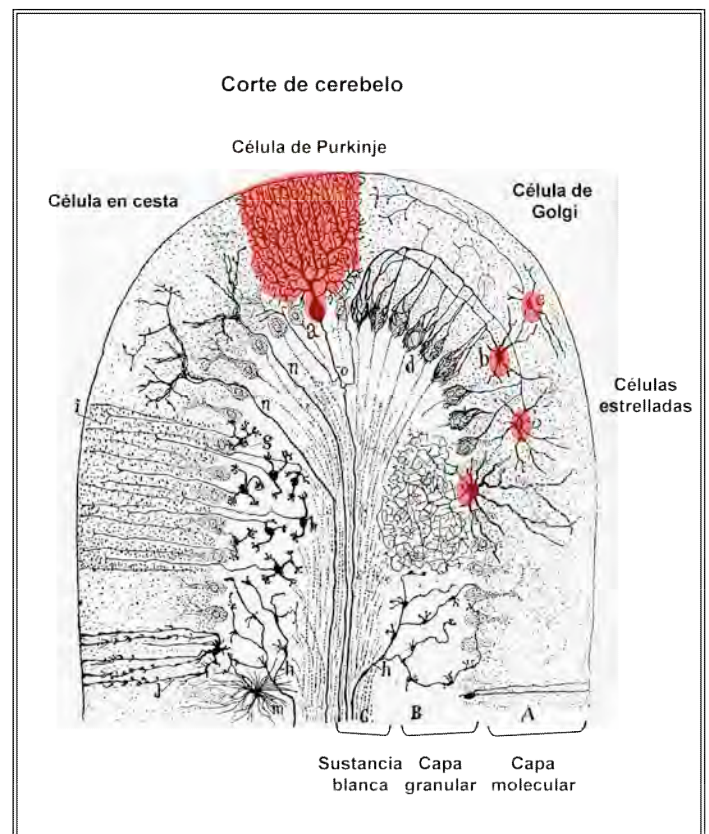


Figura 1.25 ¹⁰⁸ ¹⁰⁸,

de todas sus neuronas, en una estructura muy compacta y altamente organizada¹.

El cerebelo está implicado en funciones como el control del equilibrio, el ajuste de la acción motora, el tono muscular¹ y quizás también en algunos aspectos cognitivos, como el lenguaje en humanos⁵. Se ha estudiado intensamente en los últimos 25 años para describir la neuroquímica del GABA⁵, siendo la corteza cerebelosa una estructura especialmente rica en estructuras GABAérgicas⁴⁰.

Los botones GABA(+), son mas abundantes en la capa molecular que en la capa granular⁴⁰. Las células en cesta y estrelladas de la capa molecular, también son GABAérgicas y expresan GAD^{5, 40, 105}.

Las células de Golgi – pertenecientes a la capa granular⁵ se pueden dividir en dos sub-poblaciones: Aquellas que usan el GABA^{105, 106} como neurotransmisor y las que usan la Glicina¹⁰⁷. Las otras células que están en esta capa -las células granulares-, expresan receptores de GABA¹⁰⁵, para poder procesar la entrada de información GABAérgica desde las células de Golgi¹⁰⁶, pero no lo usan como neurotransmisor, sino que usan el ácido glutámico⁹⁷.

La capa de células de Purkinje que aparece a continuación, fueron las primeras neuronas de vertebrados reconocidas como gabérgicas⁴⁰, estas células son la única salida de información del cerebelo y Masao Ito demostró que todas las neuronas de Purkinje usan el GABA como neurotransmisor¹. Estas neuronas son visualmente las mas impresionantes del cerebro de vertebrados¹⁰⁸, con un gran soma y un elaborado árbol dendrítico¹⁰⁵ que se extiende a lo largo de la capa molecular⁵.

Aunque como hemos visto anteriormente la mayoría de las células GABAérgicas son interneuronas y actúan en circuitos locales, algunas de ellas puede actuar como neuronas de proyección, como las células de Purkinje¹; en el cerebelo se han encontrado algunas otras neuronas GABAérgicas de proyección en los núcleos corticales cerebelosos¹⁰⁹.

TIPOS CELULARES DE CEREBELO	EXPRESAN GAD USAN EL GABA COMO NT	EXPRESAN RECEPTORES GABA SUB-UNIDADES DE GABA-A
Células estrelladas	GABA – NT	$\alpha 3\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{S-}\gamma 2\text{L}$
Células de Purkinje	GABA-NT	$\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\beta 3\text{-}\gamma 2\text{L-}\gamma 2\text{S}$
Células en cesta	GABA-NT	$\alpha 1\text{-}\beta 2\text{-}\gamma 2\text{S-}\gamma 2\text{L}$
Células de Golgi	GABA-NT	$\alpha 2\text{?}\text{-}\alpha 3\text{?}\text{-}\gamma 1\text{?}$
Células granulares	NO	$\alpha 1\text{-}\alpha 6\text{-}\alpha 4\text{-}\beta 2\text{-}\beta 3\text{-}\beta 1$ $\gamma 2\text{S-}\gamma 2\text{L-}\gamma 3$

Figura 1.26. Diferentes tipos celulares presentes en cerebelo. Expresión de GABA y receptores¹⁰⁵.

Hipotálamo

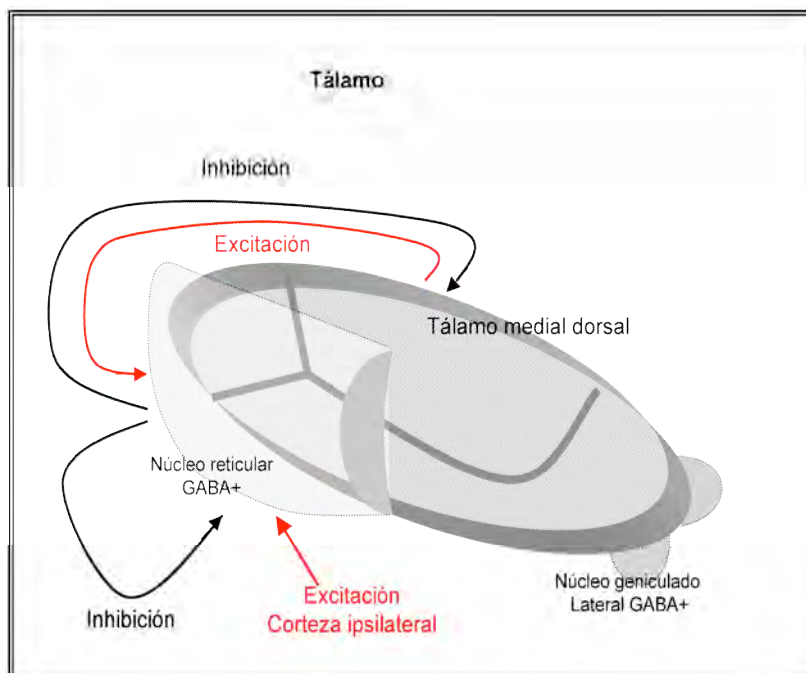
Se ha observado que el GABA suprime la función de las neuronas hipotalámicas y modula la secreción hormonal, tanto en el hipotálamo como en la pituitaria; por lo tanto se ha sugerido que es el neurotransmisor inhibitor dominante en el hipotálamo¹¹⁰.

El hipotálamo como estructura implicada en la actividad neurosecretora de hormonas ha sido ampliamente estudiado, y se ha detectado la presencia de neuronas GABAérgicas^{10, 111} que juegan un importante papel en la modulación de la producción y segregación¹¹¹. Encontramos inervación GABAérgica en 5 núcleos del hipotálamo basal: el núcleo supraquiasmático, el núcleo supraóptico, el núcleo arcuato, el núcleo medial parvocelular paraventricular y el núcleo lateral magnocelular paraventricular¹¹¹. El GABA esta asociado al 50% de todos los botones pre-sinapticos¹¹⁰.

Tálamo

El tálamo, es una estructura compleja formada por varios núcleos, donde encontramos presencia de células GABA inmunoreactivas en el núcleo reticular del tálamo^{5, 40, 112, 113} y en el núcleo geniculado lateral¹¹², que forma parte de la vía óptica, mientras que no se encuentran en los núcleos ventrolateral, intralaminar, talámicos mediales y el ventrobasal¹¹².

EL núcleo reticular del tálamo es una hoja de neuronas de unos 200 μm de grosor en la rata que encapsula zonas rostrales y laterales del tálamo dorsal¹¹⁴. Las neuronas GABAérgicas son las células mayoritarias del núcleo reticular del tálamo¹¹³ y también positivas para parvoalbumina⁵. Y reciben entradas de células GABAérgicas de proyección desde el prosencefalo caudal basal¹¹⁴.



Las células del núcleo reticular del tálamo (NRT) generan un sistema de autoinhibición¹¹² y son la fuente de la inhibición GABAérgica, recurrente y de corta latencia y bilateral⁵ sobre el tálamo dorsal^{5, 40, 114}.

Figura 1.27^{1, 112}.

Este núcleo NTR es un núcleo compuesto enteramente por neuronas GABAérgicas, que funcionan como un marcapasos que sincroniza las oscilaciones tálamo corticales¹¹⁵.

Retina

Hay numerosos estudios sobre los neurotransmisores presentes en diferentes tipos celulares de la retina, detectándose la presencia de células GABAérgicas por ejemplo en las células amacrinas de la retina^{1,116}. La inmunoreactividad al GABA también se ha asociado con la capa plexiforme externa estos procesos son derivados de las células GABA(+) horizontales¹¹⁶.

Núcleos septales

La tinción para la enzima GAD en el neuropilo es intensa en el núcleo septal lateral y en cambio es débil o moderado en otros núcleos como el septum medial, el núcleo de la banda diagonal de Broca y el núcleo (bed) de la estria terminal⁴⁰.

Los cuerpos celulares GAD(+) presentes en las zonas septales pertenecen a dos tipos de células⁴⁰:

- Grupo de pequeñas neuronas en el núcleo septal lateral, especialmente en la parte dorsal.
- Grupo de células grandes en el núcleo de la banda diagonal de Broca y el septo medial.

La mayoría de las terminales GABAérgicas del área septal corresponden a neuronas intrínsecas⁴⁰.

Hipocampo

En animal adulto en el hipocampo¹¹⁷, las neuronas GABA son células no-piramidales que están localizadas fuera de la capa piramidal y fuera de la capa

granular. Estas células no-piramidales según estos autores representan menos del 10% de la población celular¹¹⁷. La población del hipocampo esta formada por¹¹⁸:

- células granulares 10^6
- células piramidales 4×10^5
- células no-piramidales 8×10^4

Probablemente junto al cerebelo, el hipocampo sea otra de las estructuras mas estudiadas desde el punto de vista de la morfología, así como de los circuitos y los neurotransmisores que utilizan²⁴. Diversos estudios indican que tanto el GABA como la enzima GAD están presentes en el hipocampo aunque las diversas láminas presentan diferentes cantidades de marcaje⁴⁰.

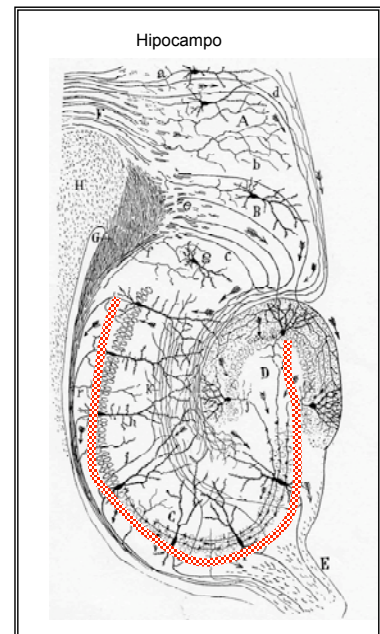


Figura 1.28¹⁰⁸

Estas células GABAérgicas que representan un 11% del total de neuronas del hipocampo, son interneuronas¹¹⁸ y su función parece estar relacionada con el control del flujo de información a través del hipocampo ya que todas las sinapsis de los pasos intermedios de este circuito usan glutámico⁹⁷ pero están modulados por sinapsis GABAérgicas de las interneuronas. Estas células además son positivas para otros péptidos como la sustancia P^{40, 118}.

Las terminales GABAérgicas del hipocampo, forman un denso plexo sobre los somas de las células piramidales de las regiones C1-C3 y alrededor de las células granulares de la fascia dentada, siendo especialmente alta en las células C3⁴⁰. Estos botones GABA(+) se encuentran sobre el segmento anterior de la célula, especialmente el soma como hemos dicho anteriormente, las dendritas basales y apicales, el cono axónico y el segmento inicial. También aparecen terminales GABAérgicas sobre las propias interneuronas del las áreas C1, C3 y de la fascia

dentada⁴⁰, permitiendo esbozar la posibilidad de un circuito de auto inhibición como veíamos en el apartado anterior del NRT.

La mayoría de las terminales GABAérgicas del hipocampo son intrínsecas, es decir de circuitos locales, pero reciben también entradas GABAérgicas de otras zonas como⁴⁰:

- Corteza entorinal vía “ruta perforada”
- Del septum vía fimbria-fornix
- De fibras septo-hipocámpicas.

Ganglios basales / Complejo estriado-palidal

En muchos de los textos consultados hemos encontrado como ejemplo de circuito gabaérgico el que implica el control motor entre los núcleos del mesencéfalo y complejo estriado palidal^{1, 5, 15}. Este complejo circuito se ha estudiado desde muchos puntos de vista, pero la inmunocitoquímica de la GAD ha puesto de relevancia el papel importante de la inhibición¹⁰.

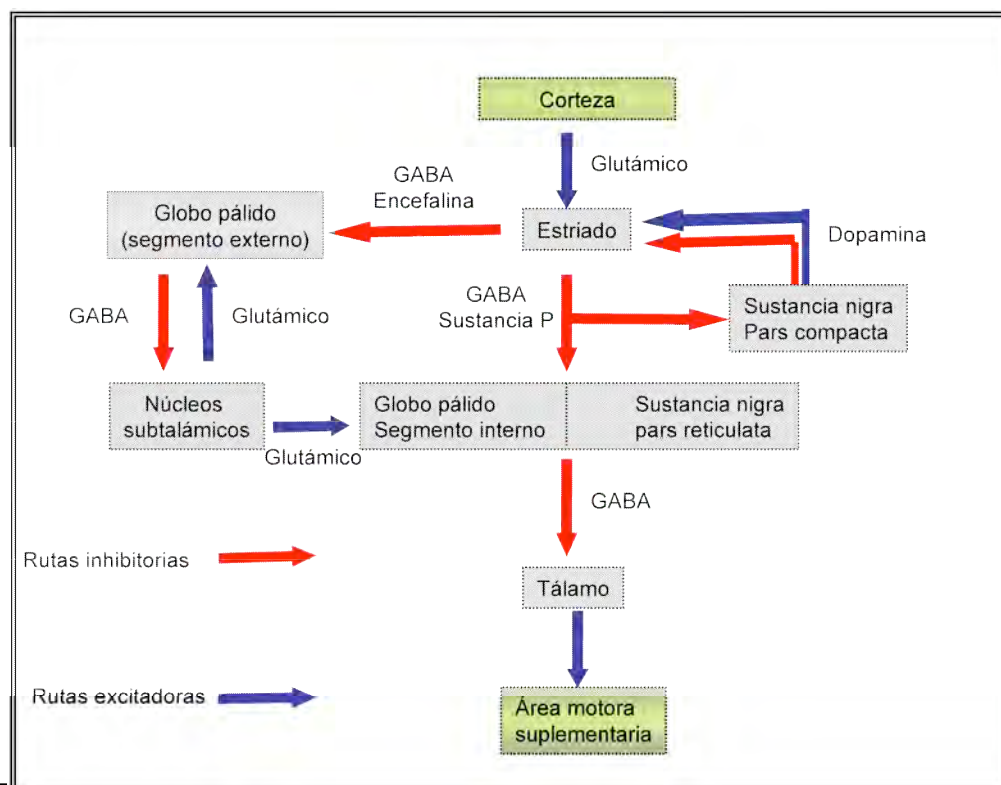


Figura 1.29¹

En función de la presencia de marcaje GAD se han establecido varias zonas – el concepto de zona fue propuesto por Nauta Jr¹⁰. La zona 1 representa el allocortex y el neocortex, la zona 2 –estriado- consiste en el caudado y putamen, núcleo accumbens y el tubérculo olfativo incluyendo grupos de células granulares de la isla de Calleja, y la zona 3 - pálido- que agrupa al globo pálido, el núcleo entopeduncular, el pálido ventral y la sustancia nigra pars reticulata¹⁰.

La zona 1 presenta una densidad de terminales axónicas de baja a media y una densidad de cuerpos celulares en el rango bajo medio, en comparación con la zona 2 que se caracteriza por una densidad media/alta de puntos GAD(+) y por una alta densidad de cuerpos celulares. Finalmente la zona 3 muestra la densidad mas alta tanto de terminales peridendriticas y perisomáticas, así como de cuerpos celulares¹⁰.

En el estriado del adulto las aferentes dopaminérgicas ejercen un control inhibitorio sobre la expresión de la enzima de síntesis GAD¹¹⁹.

En el núcleo accumbens se han detectado que hay altos niveles de tinción con GAD en este area⁴⁰.

Corteza Cerebral

Como muy bien describió Cajal en su histología del cortex, se pueden observar dos grandes grupos de células: Las células piramidales y el otro gran grupo son las células no-piramidales¹. Estas dos tipos de células difieren en muchas características morfológicas, funcionales además de neuroquímicas.

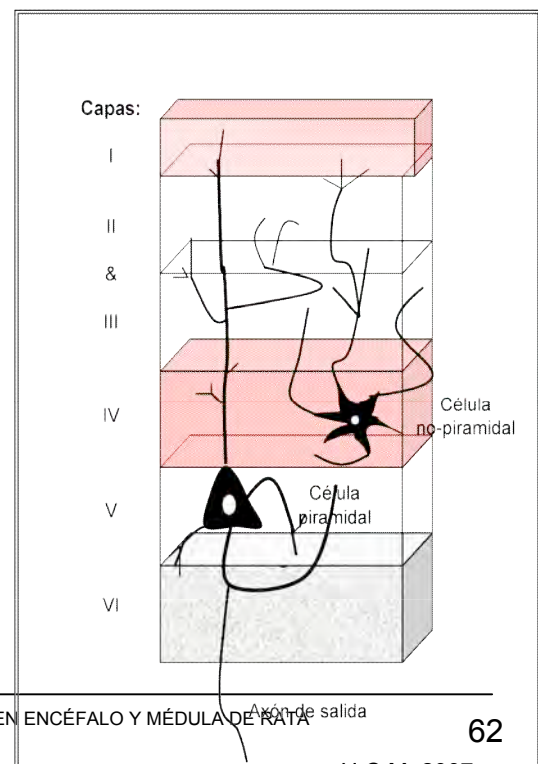


Figura 1.30¹

Las neuronas piramidales son de proyección es decir son la vía de salida de la corteza, usan el glutámico o el aspártico como neurotransmisor^{1, 120}. Las células no-piramidales o interneuronas usan el GABA como neurotransmisor¹²⁰. Su función es variada ya que aunque se pensaba que actuaban únicamente como interneuronas en circuitos locales hoy sabemos que también pueden recorrer distancias mayores, aunque no se puedan denominar neuronas de proyección como las típicas neuronas piramidales. Estas neuronas no-piramidales se pueden clasificar morfológicamente en varios subtipos y tienen elaboradas ramificaciones axonales y diversos nombres que hacen referencia a ello¹.

Todas estas neuronas no-piramidales que actúan sobre la elaboración y modulación de la respuesta de salida de las neuronas piramidales, como hemos dicho anteriormente, usan fundamentalmente el GABA como neurotransmisor¹.

El porcentaje de células no-piramidales / piramidales, en la corteza es variable a lo largo del desarrollo y por lo tanto de sus respectivos neurotransmisores, pero teniendo en cuenta que la corteza es la zona cerebral con mayor número de neuronas, a excepción del cerebelo, tiene toda la razón de ser, el dato que dábamos al inicio de este apartado: el GABA es el neurotransmisor mas abundante en sistema nervioso central de mamíferos⁴⁰.

El GABA se encuentra en todas las capas de la corteza, pero abunda más en unas que en otras, de hecho el GABA o su enzima de síntesis se detectan, usando técnicas de inmunotinción en todas las áreas corticales^{1, 17} en neuronas no-piramidales.

La capa I que es la mas externa y esta justo debajo de la pía mater¹. Esta capa tiene pocos cuerpos celulares y esta compuesta por axones que corren lateralmente a la superficie; en esta capa todas las neuronas son células denominadas Cajal-Retzius y presentan el GABA como neurotransmisor¹⁴. La

capa II presenta fundamentalmente pequeñas neuronas piramidales¹ y la capa III con grandes neuronas piramidales¹, son la principal fuente de salida de información hacia otras áreas corticales. La capa IV es rica en neuronas no-piramidales y recibe la mayoría de axones con entrada de información que proviene del tálamo¹. La Capa V contiene la grandes neuronas piramidales, estas neuronas son el origen de los largos axones que salen de la corteza y descienden hasta los ganglios basales, el tronco del encéfalo y la medula espinal¹. Finalmente la capa VI contiene neuronas piramidales que proyectan sus axones sobre el tálamo¹, la sustancia blanca que se encuentra justo debajo de la capa VI lleva los axones de entrada y salida del cortex¹.

Bulbo Olfativo

La visualización de la tinción para GAD en el bulbo olfativo nos muestra un gradiente radial que es mas intenso en los glomérulos y la capa plexiforme y menos intenso en el neuropilo y las capas profundas⁴⁰. Se han identificado como neuronas GABAérgicas las células granuales¹, las células periglomerulares son positivas para GAD, así como las células de axón corto⁴⁰.

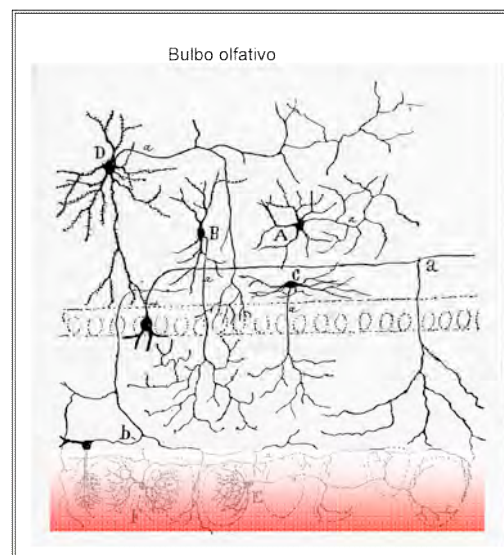


Figura 1.29¹⁰⁸

Resumiendo los datos, anteriormente expuestos, podemos observar que existen dos tipos de áreas que exponemos a continuación (en presentación caudo-cefálica):

1. Áreas cerebrales ricas en cuerpos celulares GABAérgicos¹⁰:

- Medula espinal

Rexed I-III

Rexed X

- Núcleos del rafe

- Formación reticular
- Romboencéfalo
- Cerebelo:
 - Células de Purkinje
 - Células en cesta
 - Células estrelladas
- Órgano periventricular: Area postrema
- Sustancia gris central
- Mesencéfalo
- Hipotálamo
- Tálamo:
 - Sustancia gris central
 - Núcleo reticular del tálamo
 - Núcleo geniculado lateral
- Septum
- Hipocampo:
 - Giro dentado
 - Cuerno de Ammon
 - Ganglios basales y complejo amigdalario: Estriado, Pálido
 - Amígdala
- Neocortex:
 - Capa I: lámina molecular
- Sustancia blanca subcortical
- Bulbo olfativo – Rinencéfalo

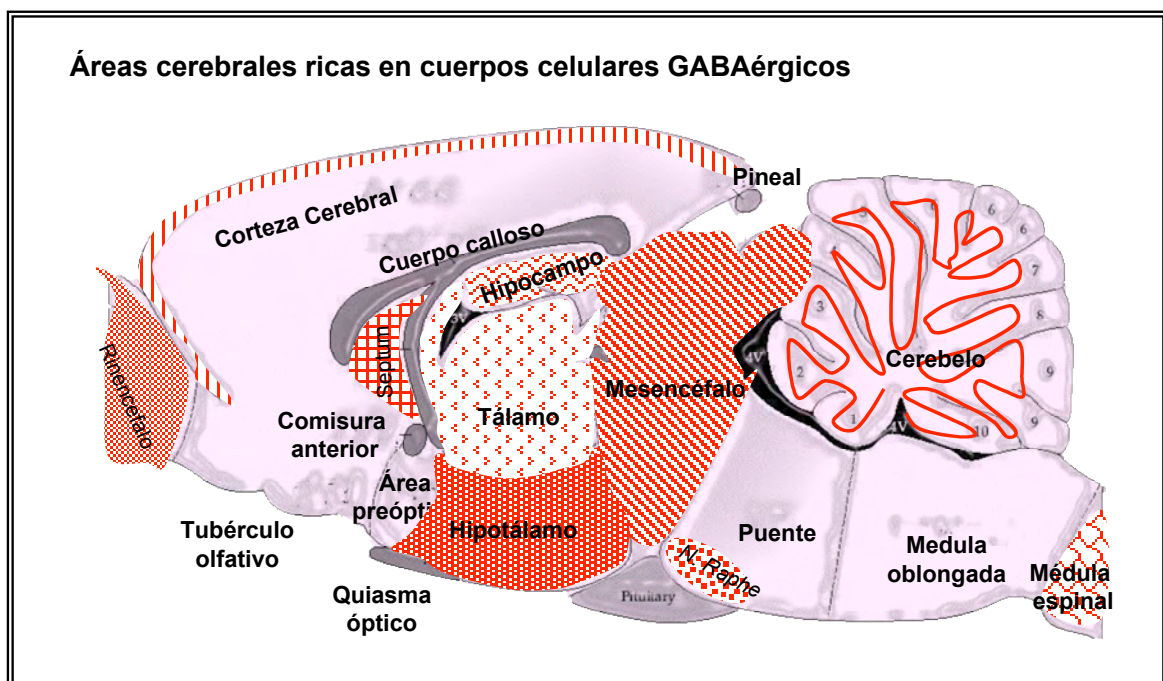


Figura 1.32¹²¹2. Áreas cerebrales ricas en terminales GABAérgicas¹⁰:

▪ Medula espinal:

Rexed I
 Rexed IIb y IIIa
 Rexed IV
 Rexed X

- Núcleo del rafe pálido parte ventral
- Romboencéfalo
- Cerebelo
- Órgano paraventricular
- Sustancia gris central
- Mesencéfalo
- Hipotálamo
- Tálamo
- Septum y banda diagonal
- Ganglios basales y complejo amigdalario: Estriado, Pálido, Complejo amigdalario
- Bulbo olfativo – Rinencéfalo

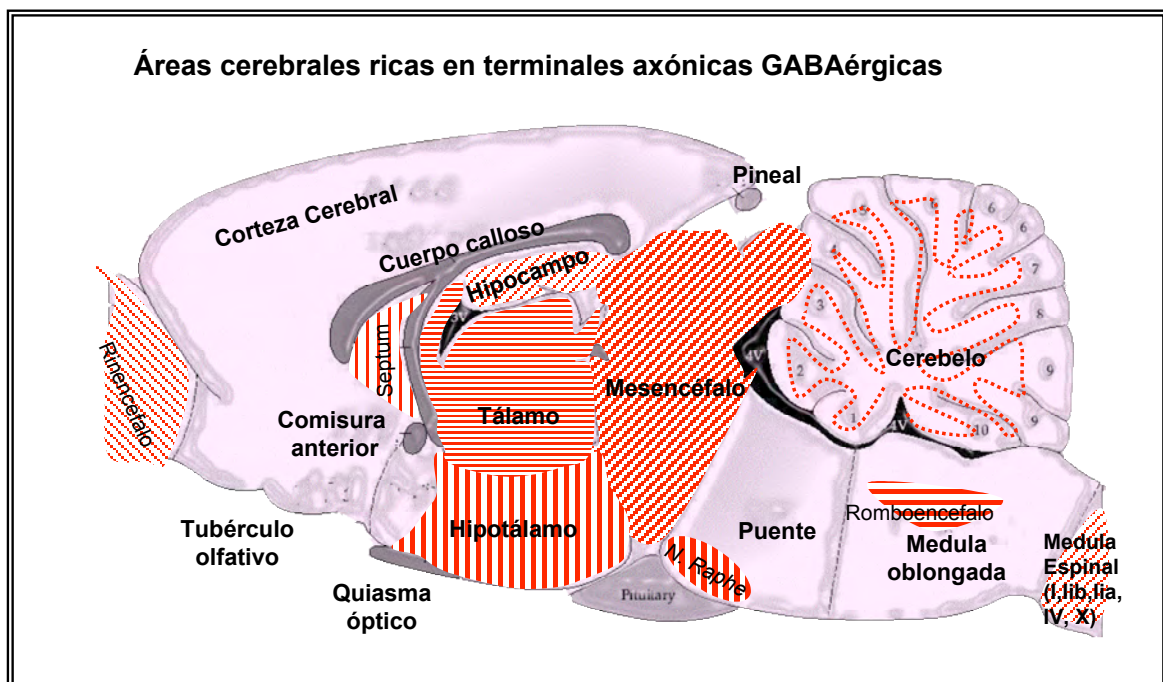


Figura 1.33¹²¹

Hemos incluido algunas figuras para facilitar la ubicación espacial del GABA en las distintas áreas del cerebro de rata adulta. Algunos de estos diagramas se han realizado basándose en los mapas cerebrales del Atlas esterotáxico de rata adulta, realizado por Paxinos y Watson¹²¹.

REFERENCIAS DE LA INTRODUCCIÓN:

- ¹ Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM. Principles in Neural Science. 3º ed. New York: Elsevier; 1991.
- ² Carlson NR. Fisiología de la Conducta. Traducción de la 6ª ed en ingles. Barcelona: Ariel Neurociencia; Oct. 1999.
- ³ Damasio A. En busca de Spinoza. Neurobiología de la emoción y los sentimientos. Traducción de ed. inglesa de 2003. Barcelona: Ed. Critica S.L; 2005.
- ⁴ Citar a Freud según Charo
- ⁵ Butler AB, Hodos W. Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Evolution and Adaptation. 1st ed. New York: Wiley-Liss, Inc; 1996.
- ⁶ Von Boleen O. Dermietzel R, Neurotransmitters and Neuromodulators. 1st ed. Asterdam: Wiley-VCH Verlag GMBH Winheim; 2002.
- ⁷ Otsuka M, GABA and some other transmitter candidates in the nervous system. Proceedings of the V International Congress on Pharmacology. 1973; 4: 186-201.
- ⁸ Smith CM, Elements of Molecular Neurobiology. 2nd ed. New York: John Weley & son Ltd;1997.
- ⁹ "El uso fundamental de los aa dentro de la célula y del organismo, es la de bloques de construcción para las proteína corporales, enzimas, hormonas y proteínas estructurales y cada celula tiene capacidad de sintetizar enormes cantidades de proteinas especificas según el programa de activación de su DNA". Mahan LK. Escott-Stump S, Nutrición y Dietoterapia - Krause. 9ª edición ingles. México: McGraw-Hill Interamericana Editores; 1998.
- ¹⁰ Mugnaini E, Oertel WH. Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol 4: GABA and Neuropeptides in CNS, Part I. 1st ed. Ámsterdam: A Björklund and Hökfelt - Elsevier Science Publishers BV; 1985.
- ¹¹ Prosser CL, Comparative animal physiology. 4ª ed. New York: Wiley-Liss; 1991.
- ¹² Goodman GA, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Las bases farmacológicas de la terapéutica Vol 1. 9ª ed. México: McGraw-Hill, Interamericana Editores S.A.; 1996.
- ¹³ Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Johnston GA, McLennan H. Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. Brain Res. 1971; 33: 57-73.
- ¹⁴ Wolff JR. Evidence for a dual role od GABA as synaptic transmitter and promoter of synaptogenesis. Advances in biochemical psychopharmacology. 1981; 459-466.
- ¹⁵ Guyton AC. Anatomía y fisiología del Sistema Nervioso. 2ª ed. México: Neurociencia Básica. Editorial Medica Panamericana; 1994.
- ¹⁶ Kimelberg H, Norenberg M. Astrocitos. Investigación y Ciencia. Jun 1989; 19-27.

- ¹⁷ Tohyama M, Takatsuji K. Atlas of Neuroactive substances and their receptors in the rat. 1st ed japones 1993. Oxford: Oxford University Press; 1997.
- ¹⁸ Kristt DA, Waldman JV. Late postnatal changes in rat somatosensory cortex. Temporal and spatial relationships of GABA-T and AchE. *Anatomy and Embriology* 1986; 174(1):115-22.
- ¹⁹ Rumigny JF, Cashh C, Mandel P, Maitre M. Ontogeny and distribution of specific succinic semialdehyde reductase apoenzyme in the rat brain. *Neurochem res.* 1982 May; 5: 555-61.
- ²⁰ Rosina A, Morara S, Provini L. GAT-1 developmental expression in the rat cerebellar cortex: basket and pinceau formatioun. *Neuroreport.* 1999 Jan 18; 10(1): 27-32.
- ²¹ Minelli A, Barbaresi P, Conti F. Postnatal development of high-affinity plasma membrane GABA transporters GAT-2 and GAT-3 in the rat cerebral cortex. *Developmental brain research.* 2003; 142 (1): 7-18.
- ²² Schousboe A, Waagepetersen HS. Glial modulation of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Curr Top Med Chem.* 2006; 6(10): 929-34.
- ²³ Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.D. *Molecular Biology of the Cell.* 1 st ed. New York & Londres : Garland Publishing Inc; 1983.
- ²⁴ Hammond C. *Cellular and Molecular Neurobiology.* 1st ed. New York: Academic Press; 2001.
- ²⁵ A lo largo de la elaboración de esta tesis hemos tenido que ir cambiando nuestra concepción del GABA, partíamos del estudio del neurotransmisor inhibidor mas potente de S.N.C. de vertebrados e invertebrados y hemos llegado a ver como en periodos tempranos del desarrollo funciona como excitador. Por motivos logísticos hemos querido mantener en esta introducción el papel clásico de inhibidor y describirlo lo mas claramente posible. Y hemos dejado para la discusión, una vez hayamos presentado los resultados, la interpretación de las posibles consecuencias que tiene actuar como excitador en las primeras fases del desarrollo y como inhibidor posteriormente.
- ²⁶ Flames N, Marin O. Developmental mechanisms underlying the generation of corticall interneuron diversity. *Neuron.* 2005 May; 46(3):377-81.
- ²⁷ De Felipe J. El cerebro en el espacio. *Mente y Cerebro.* Investigación y Ciencia. 2002; 1: 72-81.
- ²⁸ Balcar VJ, Dammasch I, Wolff JR. Is there a non-synaptic component in the K⁺-stimulated release of GABA in the developing rat cortex?. *Brain res.* 1983; 312(2):309-11.
- ²⁹ Somogyi R, Wen XM, Ma W, Barker JL. Developmental kinetics of GAD family mRNA parallel neurogenesis in the rat spinal cord. *J Neurosci.* 1995 April; 15(4): 2575-2591.
- ³⁰ Martín DL, Martín SB, Wu SJ, Espina N. Regularory properties of brain decarboxylase (GAD): the apoenzye of GAD is present principally as smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J. Neurosci.* 1991;11: 2725-2731.
- ³¹ Behar T, Ma W, Hudson L, Barker J. Análisis of the anatomical distribution of GAD 67 mRNA encoding truncated glutamic acid decarboxylase proteins in the embryonic rat brain. *Dev brain res.* 1994;77: 77-87.
- ³² Greif KF, Tillakaratne NJ, Erlander MG, Feldbulum S, Tobin AJ. Transient increase in expression of glutamate decarboxylase (GAD) mRNA during the postnatal development of the rat striatum. *Developmental Biology.* 1992 Sep; 153(1):158-64.
- ³³ Phelps PE, Alijan A, Tran TA. Ventrally located commisural neurons express the gabaergic phenotype in developing rat spinal cord. *J comp neurol.* 1999; 409 : 285-298.
- ³⁴ Kuppers E, Sabolek M, Anders U, Pilgrim C, Beyer C. Developmental regulatin of glutamic acid decarboxylase mRNA expression and splicing in the rat striatum by dopamine. *Molecular brain res.* 2000 Sep; 81(1-2):19-28.

- ³⁵ Szabo G, Kartarova Z, Hoertnagi B, Somogyi R, Sperk G. Differential regulation of adult and embryonic glutamate decarboxylase in rat dentate granulate cells after kainate-induced limbic seizures. *Neurosci.* 2000; 100(2): 287-95.
- ³⁶ Balcar VJ, Zetsche T, Wolff JR. Glutamate decarboxylase in developing rat neocortex: does it correlate with the differentiation of GABAergic neurons and synapsis?. *Neurochem res.* 1992 Mar; 17 (3):253-60.
- ³⁷ Hedner T, Iversen K, Lunndborg P. Central GABA mechanisms during postnatal development in the rat: Neurochemical Characteristics. *J neural trans.* 1984;59(2):105-18.
- ³⁸ Ma W, Behar T, Chang L, Barker JL. Transient increase in expression of GAD65 and GAD67 mRNAs during postnatal development of the rat spinal cord. *J comp. neurol.* 1994 Aug; 346(1): 151-60.
- ³⁹ Yamasaki EN, Barbosa VD, De Mello FG, Hokoc JN. GABAergic system in the developing mammalian retina: dual sources of GABA at the early stages of postnatal development. *International J dev neurosci.* 1999 Jun; 17(3):201-13.
- ⁴⁰ Sivilotti L, Nistri A. GABA receptor mechanisms in the Central Nervous System. *Progress in Neurobiology-Pergamon Press.* 1991; 36: 35-92. 1991.
- ⁴¹ Roth G. Bases nerviosas de la conciencia. *Mente y Cerebro. Investigación y Ciencia.* 2002; 1: 12-21.
- ⁴² Kalin NH. Neurobiología del miedo. *Investigación y Ciencia. Temas* 32. 2003; 64-71.
- ⁴³ Golleman D. Inteligencia Emocional. 9ª ed. Barcelona: Ed Kairós; 1996.
- ⁴⁴ LeDoux JE. Emoción, memoria y cerebro. *Investigación y Ciencia. Temas* 28. 2002; 36-43.
- ⁴⁵ Vela A. Presentación en Iº Congreso de Sueño y Ansiedad. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. Departamento de Psiquiatría. Octubre 2003.
- ⁴⁶ Snyder S. Drogas y Cerebro. Barcelona: Biblioteca Scientific American. Prensa Científica S.A. 2000.
- ⁴⁷ Pero no el único. A partir del siglo XIX con Sigmund Freud aparece la psicoterapia, que ha ido evolucionando en distintas áreas o ramas: psicoanalista, gestaltica, conductista, cognitivista, etc.
- ⁴⁸ Tallman JF, Thomas JW, Gallager DW. GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature* 1978; 274: 383-385.
- ⁴⁹ Barnard EA, Darlison MG, Seeburg P. Molecular biology of the GABA-A receptor. The receptor/channel superfamily. *Trends Neurosci.* 1987; 10: 502-509.
- ⁵⁰ Antonopoulos J, Pappas IS, Parnavelas JG. Activation of the GABA-A receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. *Eur J Neurosci.* 1997; 9: 291-298.
- ⁵¹ Davis AM, Pensuchuck S, Fritschy JM, McCarthy MM. Developmental switch in the expression of GABA-A receptor subunits alpha(1) and alpha(2) in the hypothalamus and limbic system of the rat. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000 Jan; 119(1): 127-28.
- ⁵² Luque JM, Malherbe P, Richards JG. Localization of GABA-A receptor subunits mRNA in the rat locus coeruleus. *Brain Res Mol Brain Res.* 1994 Jul; 24(1-4):219-26.
- ⁵³ Wisden W, Korpi ER, Bahn S. The cerebellum: a model system for studying GABA-A receptor diversity. *Neuropharmacol.* 1996; 35 (9-10): 1139-1160.
- ⁵⁴ Jones A, Korpi ER, McKernan RM, Pelz R, Nusser Z, Mäkelä R, Mellor JR, Pollard S, Bahn S, Stephenson FA, Randall AD, Sieghart W, Somogyi P, Smith AJH, Wisden W. Ligand-gated Ion channel subunit partnerships: GABA-A receptor $\alpha 6$ subunit gene inactivation inhibits δ subunit expression. *J Neurosci.* 1997 Feb; 17(4):1350-1362.
- ⁵⁵ Mellor JR, Merlo D, Jones A, Wisden W, Randall AD. Mouse cerebellar granule cells differentiation: Electrical activity regulates the GABA-A receptor $\alpha 6$ subunit gene. *J. Neurosci.* 1998 April; 18(8): 2822-2833.

- ⁵⁶ Duffy FH, Burchfiel JL, Mower GD, Joy RM, Snodgrass SR. Comparative pharmacological effects on visual cortical neurons in monocular deprived cats. *Brain res.* 1985 Jul; 339(2): 257-64.
- ⁵⁷ Incluimos aquí este artículo, que está realizado en gato, aunque a nosotros lo que nos ocupa es la rata, porque fue el estudio original, que dio pie, posteriormente a estudios en otras especies. Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Johnson GR, McLennan H. Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. *Brain research*, 33 (1971)57-73.
- ⁵⁸ Bowery NG, Hill DR, Hudson AL. Characteristics of GABA-B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br.J.Pharmac.* 1983; 78: 191-206.
- ⁵⁹ Ige AO, Bolam JP, Billinton A, White JH, Marshall FH, Emson PC. Cellular and sub-cellular localization of GABA-B1 and GABA-B2 receptor proteins in the rat cerebellum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2000 Nov; 83 (1-2): 72-80.
- ⁶⁰ Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Mohler H. GABA-B receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci.* 1999 Mar; 11(3):761-8.
- ⁶¹ Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Paulsen O, Fairen A, Lujan R. Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development. *Eur J Neurosci.* 2002 Jun; 15(11):1766-78.
- ⁶² Amantea D, Tessari M, Bowery NG. Reduced G-protein coupling to the GABA-B receptor in the nucleus accumbens and the medial prefrontal cortex of the rat after chronic treatment with nicotine. *Neurosci. lett.* 2004 ; 355: 161-164.
- ⁶³ Pozza MF, Manuel NA, Steinmann M, Froestl W, Davies CH. Comparison of agonist potencies at pre- and post synaptic GABA-B receptors at inhibitory synapses in the CA1 region of the rat hippocampus. *British J Pharmacol.* 1999 May; 127(1):211-9.
- ⁶⁴ Bowery NG, Hudson AL, Prince GW. GABA-A and GABA-B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neurosci.* 1987; 20: 365-383.
- ⁶⁵ Turgeon SM, Albin RL. Postnatal ontogeny of GABA-B binding in rat brain. *Neurosci.* 1994 Sep; 62(2): 601-13.
- ⁶⁶ Martín SC, Steiger JL, Gravielle MC, Lyons HR, Russek SJ, Farb DH. Differential expresión of gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit mRNAs in the developing nervous system and receptor coupling to adenylyl cyclase in embryonic neurons. *J com. neurol.* 2004; 473 (1): 16-29.
- ⁶⁷ Kim MO, Li S, Park MS, Hornung JP. Early fetal expresión of GABA-B1 and GABA-B2 receptor mRNAs on the development of rat central nervous system. *Dev brain res.* 2003; 143(1): 47-55.
- ⁶⁸ Li S, Park MS, Kim MO. Prenatal alteration and distribution of the GABA(B1) and GABA(B2) receptor subunit mRNAs during rat central nervous system development. *Brain res. dev. brain res.* 2004 Jun; 150(2):141-50.
- ⁶⁹ Li SP, Kim JH, Park MS, Chung BC, Kim MO. Etanol modulates the expresión of GABA(B) receptor mRNAs in the prenatal rat brain in an age and area dependent manner. *Neurosci.* Jul 2005. Electronic pub ahead of print.
- ⁷⁰ Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Vida A, Fairen A, Lujan R. Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABA-B1a/b and GABA-B2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus* 2004; 14(7): 836-48.
- ⁷¹ Sands SA, Purisai MG, Chronwall BM, Enna SJ. Ontogeny of GABA-B receptor subunit expresión and function in the rat spinal cord. *Brain res.* 2003; 972 (1-2): 197-206.

- ⁷² Behar TN, Smith SV, Kennedy RT, McKenzie JM, Maric I, Barker JL. GABA-B receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cerebral cortex*. 2001; 11(8): 744-53.
- ⁷³ Mott DD, Lewis DV. GABA-B receptors mediate disinhibition and facilitate long-term potentiation in the dentate gyrus. *Epilepsy-Res-Suppl*. 1992; 7: 119-34.
- ⁷⁴ Lujan R, Shigemoto R. Localization of metabotropic GABA receptor GABAB1 and GABAB2 relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum. *Eur. J. Neurosci*. 2006 Mar; 23(6): 1479-90.
- ⁷⁵ Bianchi MS, Lux-Lantos VA, Bettler B, Libertun C. Expresión of gamma-aminobutyric acid B receptor subunits in the pypothalamus of males and female developing rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005 Dec; 160(2):124-9.
- ⁷⁶ Ogurusu T, Yanagi K, Watanabe M, Fukaya M, Shingai R. Localization of GABA receptor rho 2 y rho3 subunits in rat brain and functional expression of homooligomeric rho3 receptors and heterooligomeric rho2rho3 receptors. *Receptors and channels*. 1999; 6(69): 463-75.
- ⁷⁷ Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Garret M. Expresión of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem*. 1998 Mar; 70(3):899-907.
- ⁷⁸ Alakuijala A, Palgi M, Wegelius K, Schmidt M, Enz R, Paulin L, Saarma M, Pasternack M. GABA receptor rho subunit in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005 Jan; 154(1):15-23.
- ⁷⁹ Rozzo A, Armelin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi E. Expression and dendritic mRNA localization of GABA-C receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. *Eur J neurosci*. 2002 Jun; 15 (11): 1747-58
- ⁸⁰ Behar TN, Schaffner AE, Colton CA, Somogy R, Olah Z, Lehel C, Barker JL. GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *J neurosci*. 1994 Jan; 14(1): 29-38.
- ⁸¹ Ziskind-Conhaim L. Physiological functions of GABA-induced depolarizations in the developing rat spinal cord. *Pers dev neurobiol*. 1998; 5(2-3): 279-87.
- ⁸² Behar T, Schaffner A, Laing P, Hudson L, Komoly S, Barker JL. Many spinal cord cells transiently express low molecular weight forms of glutamic acid decarboxylase during embryonic development. *Brain res. Dev brain res*. 1993 Apr; 72(2) : 203-18.
- ⁸³ Liu J, Morrow AL, Devaud L, Grayson DR, Lauder JM. GABA-A receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *J. neurosci*. 1997Apr; 17(7):2420-2428.
- ⁸⁴ Behar TN, L Y-X, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL. GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J neurosci*. 1996 March; 16(5): 1808-1818.
- ⁸⁵ Pesold C, Liu WS, Guidotti A, Costa E, Caruncho HJ. Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expresión. *Proc national academy of sciences of USA* 1999 March; 96(6): 3217-22.
- ⁸⁶ Park DS, Park JS, Yeon DS. The effects of laminin on the characteristics and differentiation of neuronal cells from epidermal growth factor-responsive neuroepithelial cells. *Yonsei medical journal* 1998 Apr; 39(2): 130-40.
- ⁸⁷ Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic response from excitation to inhibition. *Cell* 2001 May; 105(4): 521-32.
- ⁸⁸ Lo Turco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit síntesis. *Neuron*. 1995 Dec; 15(6): 1287-98.
- ⁸⁹ Solbach S, Celio MR. Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anatomy and embryology*. 1991; 184(2): 103-24.

- ⁹⁰ Luk KC, Sadikot AF. GABA promotes survival but no proliferation of parvalbumin-immunoreactive interneurons in rodent neostriatum: an vivo study with stereology. *Neurosci.* 2001; 104(1): 93-103.
- ⁹¹ Fukura H, Komiya Y, Igarashi M. Signaling pathway downstream of GABA-A receptor in the growth cone. *J neurochem.* 1996; 67: 1426-1434.
- ⁹² Runquist M, Alonso G. Gabaergic signaling mediates the morphological organization of astrocytes in the adult rat forebrain. *Glia* 2003 Jan ; 41(2); 137-151.
- ⁹³ Van den Pol AN, Obrietan K, Chen G. Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *J. Neuroscience.* 1996 Jul; 16(13): 4283-92.
- ⁹⁴ Heber R, Stromberg M. *Anatomy and Embriology of the laboratory rat.* 1st ed. Asterdam: Verlag - BioMed; 1986.
- ⁹⁵ Bates TE, Williams SR, Gaidant DG, Bell JD, Small RK, Iles RA. ¹H NMR Study of cerebral development in the rat. *NMR in Biomedicine* 1989 ; 2, (5-6): 225-229.
- ⁹⁶ Cotman CW, editor. *Synaptic Plasticity.* New York: The Guilford Press; 1985.
- ⁹⁷ Mattson MP. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain research reviews.* 1988; 13: 179-212.
- ⁹⁸ Tracey DJ, Paxinos G, Stone J. *Neurotransmitters in the Human Brain.* Advances in behavioral biology. 1st ed. New York: Plenum Press; 1995.
- ⁹⁹ Fonseca M, Soriano E. Calretinin-immunoreactive neurons in the normal human temporal cortex and Alzheimer's disease. *Brain res.* 1995; 691: 83-91.
- ¹⁰⁰ Gordienko EA, Zhubrikova LA. Ontogenetic differences of glutamate decarboxylase, GABA aminotransferase, monoamina oxidase activities of cerebral cortex mitochondria and hipotalamic cerebral area. *Ukr-Bikhim-Zh.* Traducción inglesa del Medline. 1980; 52(4):423-8.
- ¹⁰¹ Magoul R, Onteniente B, Geffard M, Calas A. Anatomical distribution and ultrastructural organization of the gabaergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibodies. *Neurosci.* 1987; 20(3): 1001-1009.
- ¹⁰² Barber RP, Vaughn JE, Roberts E. The cytoarchitecture of gabaergic neurons in rat spinal cord. *Brain Res.* 1982; 238: 305-328.
- ¹⁰³ Molander C, Grant G. Spinal cord cytoarchitecture. 1995. In G. Paxinos (Ed) *The rat nervous system.* Second edition, Academic Press. San Diego.
- ¹⁰⁴ Türk I. Raphe nuclei and serotonin containing systems. In Paxinos G, editor *The rat nervous system Vol 2.* 1st ed. New York: Academic Press; 1985.
- ¹⁰⁵ Wisden W, Korpi ER, Van S. The cerebellum: a model system for studying GABA-A receptor diversity. *Neuropharmacol* 1996; 35 (9-10): 1139-1160.
- ¹⁰⁶ Jones A, Korpi ER, McKernan RM, Pelz R, Nusser Z, Makela R et al. Ligand-gated ion channel subunit partnership: GABA-A receptor $\alpha 6$ subunit gene inactivation inhibits δ subunit expression. *J neurosci.* 1997; 17(4): 1350-1362.
- ¹⁰⁷ Shepherd GM. *Neurobiología.* 1ª ed. Madrid: Editorial Labor; 1990.
- ¹⁰⁸ Cajal SR. *Histología de sistema nervioso.* Capítulo XIX: Histogénesis del cerebelo. Alicante: Editado por el Instituto de Neurociencias Universidad de Alicante; 1992.
- ¹⁰⁹ Voogd J, Gerrits NM, Marani E. Cerebellum. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system Vol 2.* New York: Academic Press; 1985.

-
- ¹¹⁰ Chen G, Trombley PQ, Van den Pol A. GABA receptors precede glutamate receptors in hypothalamic development; differential regulation by astrocytes. *Journal of Neurophysiol.* 1985; 74(4): 1473-1484.
- ¹¹¹ Decavel C, Van del Pol A. GABA: A dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J. com neurol.* 1990; 302: 1019-1037.
- ¹¹² De Biasi S, Frassoni C, Spreafico R. GABA immunoreactivity in the thalamic reticular nucleus of the rat. A light and electron microscopical study. *Brain res.* 1986; 399: 143-147.
- ¹¹³ Houser CR, Vaughn JE, Barber RP, Roberts E. GABA neurons are the major cell type of the nucleus reticularis thalami. *Brain res.* 1980; 200: 341-354.
- ¹¹⁴ Asanuma C, Porter LL. Light and electron microscopic evidence for a gabaergic projection from the caudal basal forebrain to the thalamic reticular nucleus in rats. *J. comp neurol.* 1990; 302:159-173.
- ¹¹⁵ Gibbs JW 3er, Shroder GB, Coulter DA. GABA-A receptor function in developing rat thalamic reticular neurons: whole cell recordings of GABA-mediated currents and modulation by clonazepam. *J. Neurophysiol.* 1996; 76(4): 2568-79.
- ¹¹⁶ Osborne NN, Patel S, Beraton DW, Neuhoff V. GABA neurons in retinas of different species and their postnatal development in situ and in culture in the rabbit retina. *Cell tissue res.* 1986; 243(1): 117-23
- ¹¹⁷ Robain O, Barbin G, Ben Ari Y, Rozenberg F, Prochiantz A. Gabaergic neurons of the hippocampus: development in homotopic grafts and in dissociated cells cultures. *Neurosci.* 1987; 23(1): 73-86.
- ¹¹⁸ Sloviter RS, Ali-Akbarian L, Horvath KD, Menkens KA. Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: enhanced detection using improved immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. *J. comp neurol.* 2001; 430(3):283-305.
- ¹¹⁹ Ovtscharoff W, Eusterschulte B, Zienecker R, Reisert I, Pilgrim C. Sex differences in the densities of dopaminergic fibers and GABAergic neurons in the prenatal rat striatum. *J. com neurol.* 1992; 323(2): 299-304.
- ¹²⁰ Gotz M, Bolz J. Differentiation of transmitter phenotypes in rat cerebral cortex. *Eur J. neurosci.* 1994; 6(1): 18-32.
- ¹²¹ Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 4th ed. San Diego: Academic Press. Elsevier;1998.

APÉNDICE A LA INTRODUCCIÓN: DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RATA

Uno de los objetivos de esta tesis es que el lector cuando llegue al capítulo de resultados pueda seguirlos adecuadamente. Por ello hemos incluido este apéndice a la introducción, sobre el desarrollo embrionario de la rata, o neurogénesis^{1, 2, 3}. La introducción propiamente dicha, trata del neurotransmisor GABA - de su mecanismo de síntesis, de liberación, su función y su distribución en el cerebro de rata adulta -. Estas líneas generales sobre el desarrollo embrionario del cerebro de rata, nos permitirá localizar mejor las coordenadas espacio-temporales en las cuales se ubica nuestro trabajo.

El trabajo en sistema nervioso central de rata es abundante en la bibliografía, correspondiendo la rata a la clasificación taxonómica⁴:

Clase: Mamalia

Subclase: Prototeria

Orden: Monotremata

Rattus norvegicus

El desarrollo embrionario de la rata sigue unas pautas y patrones generales comunes a todos los mamíferos, aunque también presenta algunas particularidades¹. El periodo gestacional de la rata dura 22 días¹ denominándose por sus siglas inglesas ED – embryonic day-. La mayoría de los autores definen la noche de la copula como ED-0, y el día siguiente cuando se detecta el espermatozoide en la vagina como ED-1⁵ existen otro tipo de nomenclaturas, pero esta es la mas utilizada en la bibliografía. Del periodo gestacional (ED-0 hasta ED-22), en este trabajo nos interesa fundamentalmente a partir del ED-11 momento en el cual se produce el cierre del tubo neural⁶. Hemos encontrado en la literatura algunos datos que no son coincidentes como los estadios de 3-vesiculas y de 5-vesiculas, donde según los diferentes autores se producen en diferentes días^{5, 7} embrionarios. Ante estas

divergencias hemos optado por los datos mas recientes⁷, ya que asumimos que la tecnología va mejorando los elementos de medida.

El futuro S.N.C. parte de una organización celular, evoluciona hacia una organización histológica, para llegar a una organización neuro-funcional. En este proceso se unen por un lado el desarrollo individual de las diferentes células, y el desarrollo conjunto para dar un tejido². La elección del fenotipo del neurotransmisor es un paso crucial en el desarrollo neural⁸, en qué momento una célula elige el fenotipo del neurotransmisor GABA como neurotransmisor inhibidor frente a otros, y muy específicamente frente al Glutámico, ya que la célula precursora da tanto neuronas Gabaérgicas como glutaminérgicas, lo que sugiere que los precursores tienen el potencial de generar ambos tipos⁸.

La rata pertenece al grupo de animales que presentan un ciclo de estró corto de 4 a 5 días¹, durante el cual en el proestro crecen rápidamente los folículos, desapareciendo los restos de los cuerpos luteos de la fase anterior. Durante el estró tienen su máximo de crecimiento los folículos y al final de este periodo la hembra acepta la copula. En la siguiente fase o metestro, es cuando se produce la ovulación y se forma el nuevo cuerpo luteo y la fase final o diestro se caracteriza por el crecimiento continuo de los folículos y del cuerpo luteo¹.

ED-0

Tras la fecundación del huevo existen varios procesos hasta que entre 21 y 23 horas después de la penetración se observa el primer huso de segmentación¹.

ED-1

La primera división se produce a las 25 horas aproximadamente¹. Este huevo fecundado que se divide en dos células denominadas blastómeros, da lugar al embrión de 2-células². La segunda división tiene lugar en dos blastómeros casi simultáneamente por lo que es muy raro ver un estadio de 3-células¹.

ED-2 y ED-3

En las siguientes horas se van a seguir dividiendo dando lugar a los estadios de 4,8,16 y 32-células² y estas divisiones ocurren cada 18-24 horas aproximadamente¹. El estadio de 4-células se encuentra entre las 40 y las 70 horas después de la cópula. Esta pequeña esfera multicelular se denomina mórula².

ED-4

A continuación se produce una invaginación central y se forma un blastocisto², la pared externa queda formada por células denominadas trofoblastos que serán parte del sistema de soporte embrionario y alimentación y estará íntimamente ligado a los tejidos uterinos². Este proceso tiene lugar entre las 80 y 110 horas de la copula¹. A las 110 horas el blastocisto pasa a denominarse blástula y comienza a abandonar la zona pelúcida y se alcanza el lumen del útero¹.

Durante todo este periodo el huevo fecundado se ha dividido dando lugar a una serie de células denominadas blastómeros, y al conjunto se le llama mórula. La mórula entra en un proceso de cambios denominados gastrulación, cuyo objetivo es la formación de las tres capas embrionarias: Ectodermo, mesodermo y endodermo. Este proceso de gastrulación permite pasar al sistema de 2 a 3 planos y adquirir la 3ª dimensión^{1,3}.

Se produce una invaginación de la zona externa hacia el interior formando un poro – blastoporo –comenzando desde la zona ventral y finalmente se forman dos capas: una externa y otra interna. La porción dorsal del blastoporo tiene características organizativas de todo este proceso. La externa formará la placenta y las membranas embrionarias y se denomina trofoblasto.

La interna formada por el blastocisto – cavidad del líquido amniótico – y por las células que dan lugar al embrión. Estas células se aplanan y se forma el disco

embrionario. Este disco embrionario consta de dos capas: el epiblasto y el hipoblasto. El epiblasto dará lugar al ectodermo. El hipoblasto dará lugar al endodermo.

La formación del sistema nervioso central se inicia con la gastrulación en un proceso denominado neurulación^{1, 3}.

ED-5

Cuando la mórula llega al lumen de la cavidad uterina se prepara todo para la implantación y en la segunda parte de ED-5 la mayoría de los blastómeros han perdido la zona pelúcida y se aproximan a la superficie uterina. Al final de ED-5 estas células se unen a la capa profunda epitelial del útero, produciéndose la implantación¹.

ED-6

Durante este periodo los blastómeros aumentan de tamaño y se alargan y el epitelio se transforma en el espacio de implantación¹. En algunos estudios con marcaje radiactivo y posterior disociación y fraccionamiento de células neocorticales, se detecta la aparición de una población de células producidas en ED-6,3, que exhiben un ciclo celular de 7,6 horas y alcanzan su máximo en ED-14 con 5×10^{-6} células⁹.

ED-7

Durante la fase final de ED-6 y ED-7 tiene lugar un proceso de rápida diferenciación en el blastocisto dando lugar al nódulo ectodermal, al cono ectoplacental y a una cavidad central¹.

En ED-7/8, se detecta con marcaje radioactivo y posterior disociación y fraccionamiento celular, el nacimiento de una población de células corticales, con un ciclo de 9 horas que se expandiendo hasta ED-18 alcanzando una población total de células de $4,4 \times 10^{-7}$ células⁹.

ED-8

En este día el embrión pasa por un considerable cambio a nivel de crecimiento y de diferenciación interna¹. En este día se produce el proceso de gastrulación en la rata⁷. En ED-8 el eje longitudinal del disco trilaminar tiene forma de “U”, esta inversión de las capas embrionarias se conoce como “entipy”⁷.

Como en otros roedores la orientación del ectodermo y del endodermo difiere de otros mamíferos: el ectodermo está rodeado por el endodermo dando un disco germinal con forma de copa¹. En este momento comienza a formarse el mesodermo^{1,7}. Esta tercera capa germinal, proviene de un conjunto de células del endodermo que se desplaza². El cerebro es el primer órgano reconocible que se diferencia en el embrión y el suelo neural su primera manifestación detectable⁷. Este suelo neural es la parte más gruesa del ectodermo del disco embrionario trilaminar y es inducido por el mesodermo subyacente³.

ED-9

Los acontecimientos que ocurren entre ED-9 y ED-10 se suelen presentar juntos porque son un continuo que no tiene sentido separar¹, pero vamos a realizar un esfuerzo por sistematizar los pasos intermedios.

En ED-9 el suelo neural se ha diferenciado⁷ y las hendiduras ópticas han comenzado a evaginarse⁷ justo en el estadio de 5 somitas en este día de gestación, justo después de que haya aparecido la cabeza en el estadio de 2-3 somitas⁷. El extremo rostral del embrión ha comenzado a doblarse ventralmente formando el pliegue cefálico, el eje en forma de “U” de ED-8 se ha convertido en ED-9 en forma de “S”⁷.

En ED-9 el suelo notocordal se extiende por todo el recorrido hacia la membrana orofaríngea, en los estadios tempranos del desarrollo del disco embrionario trilaminar⁷.

En la fase inicial de la neurulación la esfera inicial del embrión sufre una elongación rostro caudal dando una estructura en forma de zapatilla². En la zona media un grupo de células forman el nódulo de Hensen, que actúa como organizador del tejido ectodérmico que se va a convertir en neuroectodermo⁵. Por su parte en el mesodermo aparecen una serie de células con forma de cuerda que se denomina notocorda². Sería éste el momento en el cual se formaría el nódulo de Hensen, pero en ratas no se desarrolla dicho nódulo¹. El mesodermo se extiende a ambos lados del plato notocordal como dos alas laterales¹.

En ED-9 se puede observar en esta región, el suelo neural, antes de que aparezcan el primer par de somitas⁷. El suelo neural temprano esta centrado en la capa ectodérmica, por lo que el neuroectodermo esta rodeado por un ectodermo somático⁷. El suelo neural esta rodeado bilateralmente y de forma simétrica, constituyendo un lado derecho y un lado izquierdo con una depresión en la línea media que constituye el surco neural, el cual define un eje longitudinal⁷. Además el suelo neural tiene una superficie ventral y otra dorsal, que da al mesodermo y a la cavidad amniótica⁷. Por lo tanto los tres ejes más importantes de organización del sistema nervioso central ya son evidentes en el estadio de disco embrionario trilaminar⁷.

Según el suelo neural se va desarrollando en ED-9, aparece una estrecha cinta longitudinal de ectodermo a nivel de lo que será el 4 somita, denominada cresta neural⁷. La cresta neural genera neuronas del sistema nervioso periférico^{2,3} y una serie de placodas que se diferencian del ectodermo somático⁷. Histologicamente este suelo neural es un epitelio pseudoestratificado de 1 célula de grosor que contiene solo células progenitoras⁷. La neurulación de la rata se produce en los estadios de 2 a 13 somitas en los días ED-9 y ED-10⁷.

La característica diferencial mas evidente del Sistema Nervioso Central de vertebrados es que se produce por invaginación frente al proceso de

delaminación de los invertebrados⁷, la rata por tanto produce su SNC por invaginación.

ED-10 – Estadio de cierre del tubo neural y 3-vesículas⁷.

Al principio de ED-10 en el estadio de 5 somitas, la región rostral del suelo neural, se ha doblado ventralmente, perpendicularmente a las partes mas caudales del suelo neural y la membrana orofaríngea se ha doblado incluso mas, es decir el disco embrionario trilaminar se ha doblado formando una “U”⁷.

Las crestas neurales se elevan y se dibujan siendo visibles en ED-10¹. Los márgenes laterales gradualmente se aproximan y se fusionan dorsalmente, la progresión de la fusión en la rata comienza en el estadio de 10-11 somitas en la mitad de ED-10, dando lugar a un neuroporo dorsal y otro caudal⁷.

En ED-10 el plato neural en ratas comienza a fusionarse y a formar el tubo neural⁵. Continúa el proceso de neurulación que había comenzado el día anterior⁷.

Según se cierra el neuroporo rostral se pueden observar las tres primeras vesículas cerebrales²:

- Prosencéfalo
- Mesencéfalo
- Romboencéfalo

En la ratas este estadio se puede reconocer durante la segunda mitad de ED-10⁷. En ED-10 no se observa capa del manto⁷. Como hemos dicho anteriormente hay autores que localizan este estadio en ED-12 donde se visualizan las tres vesículas: prosencéfalo, mesencéfalo, romboencéfalo⁵.

Este estadio de tres vesículas se corresponde con dos curvaturas o flexiones la cefálica y la cervical².

El romboencéfalo se desarrolla en un patrón segmental que especifica los lugares donde ciertos nervios craneales se originan³, a las abultamientos se les denomina “rombómeros” y cada rombómero se asocia con un territorio de desarrollo y formará un ganglio – conjunto de cuerpos neuronales cuyos axones forman un nervio – ³. En este momento inicial de la diferenciación ya se observan las áreas prospectivas de algunos de estos ganglios o núcleos en el tronco del encéfalo⁷. Los núcleos ya presentes son:

- III Oculomotor común o motor ocular común
- IV Troclear o patético
- V Trigémino
- VI Abducens o motor ocular externo
- VII Facial
- IX Glosofaríngeo
- X Vago
- XII Hipogloso

Faltan por aparecer el par I olfatorio, II óptico, VIII vestibulococlear, XI espinal accesorio⁷. El nombre de los diferentes núcleos está tomado del Kandel ² y del Carlson¹⁰.

ED-11: 4-13 somitas: Longitud C-R 2.0mm¹ - Estadio de 5-vesículas⁷

A partir de ED-11 los fetos se van a datar de forma diferente, basándose en parámetros morfológicos como la longitud CR – siglas en inglés de Crown-Rump: literalmente corona-cuartos traseros -¹. Además según diversos autores este es el día del cierre completo del tubo neural ⁶.

En el estadio de 8 somitas¹, que según estaría al final de ED-10, pero que según otros autores ya está en ED-11^{6,7} el extremo rostral del suelo neural continúa creciendo rápidamente en dirección rostral⁷ suceden dos importantes sucesos:

- La membrana orofaríngea se rompe, formando una abertura entre la cavidad oral y el intestino⁷.
- La notocorda internalizada ha reemplazado al suelo notocordal, excepto el la región caudal de la ruptura de la membrana orofaríngea. Esta región se denomina suelo precordal y se expande considerablemente y contiene una mezcla de células asociadas con el suelo notocordal rostral y la membrana orofaríngea⁷.

Los bordes del suelo neural del prosencéfalo se fusionan y el neuroporo rostral se cierra⁶ y aparece la vesícula prosencefálica⁷. A partir del momento del cierre del neuroporo rostral se ha dividido la línea media en una zona ventral o floor plate(traducida como lamina del suelo o lamina basal) y en una zona dorsal o roof plate (traducido como lamina del techo o lamina alar)⁷. Aunque existe cierto grado de controversia aún, entre los diferentes autores en la nomenclatura y en el proceso de diferenciación en este punto⁶.

Pero lo que sí observamos es que el tubo neural está polarizado a lo largo de un eje dorso-ventral³. En la medula espinal la región dorsal es donde las neuronas sensoriales reciben los estímulos , mientras que en la región ventral es donde residen las neuronas motoras y en medio residen muchas interneuronas que actúan como estaciones de relevo entre ellas². La polaridad del tubo neural es inducida por señales que provienen de su entorno mas inmediato: el patrón dorsal es impuesto por la epidermis y el patrón ventral es inducido por la notocorda³.

Un agente de la especificación ventral es la proteína “Sonic hedgehog – Alambrada sónica” inicialmente producida por la notocorda^{3,11}, esta proteína induce a las células a convertirse en la lamina del suelo o lamina basal, a su vez estas células comienzan a segregar esta proteína y se genera un gradiente de concentración de esta proteína³. Las células de la lamina basal inducen la formación de las neuronas motoras².

El patrón dorsal del tubo neural esta inducido por una superfamilia de proteínas denominadas TGF- β ³. La epidermis establece un centro de señalización que induce la expresión de algunos de los miembros de esta familia en la lamina alar del tubo neural³. Diferentes grupos de células están expuestas a diversas concentraciones de proteínas de los distintos miembros de la familia TGF- β en diferentes momentos: estos gradientes espacio temporales inducen diferentes tipos de factores de transcripción en células a diferentes distancias de la lamina alar, dado lugar a diferentes identidades celulares³. Las células de la lamina alar serán aferentes².

La maduración del mesencéfalo y el romboencéfalo esta menos estudiada⁷. La mejor manera de caracterizar el tronco del encéfalo es en relación con la medula espinal, pero hay dos diferencias obvias: Primera las laminas basal y alar del tronco del encéfalo dan lugar a grupos de células asociadas con los nervios craneales en vez de espinales. Y la segunda el romboencéfalo se distingue por la presencia del labio róbico. El labio róbico no ha sido muy bien estudiado, pero se encuentra a lo largo de la mayoría de la parte dorsal del romboencéfalo. Pero se puede decir que el cerebelo se genera de la mitad rostral, en una secuencia de acontecimientos bien estudiada. Progresivamente las partes más caudales del labio róbico pueden generar los núcleos cocleares y vestibulares, el núcleo lateral reticular y los núcleos pre-cerebelares (núcleos basal pontinogris, oliva inferior, reticular lateral núcleo externo cuneado) y los núcleos de la columna dorsal. Topologicamente el labio róbico aparece de forma dorsal a la lamina alar que genera los núcleos sensoriales asociados con el trigémino, glososfaringeo y nervio vago⁷, que podrían ser las extensiones rostrales de las columnas de la médula espinal.

En este estadio el ectodermo somático se separa completamente del neuroectodermo, cuando el neuroporo rostral se cierra y la parte del

prosencefalo del tubo neural esta completamente internalizada junto con el resto del tubo neural⁷.

En este momento se aprecia una ligera evaginación en la línea media del suelo de la vesícula prosencefálica que indica la localización del infundíbulo⁷.

Además el ectodermo somático en la línea media tiene forma de “U” y esta junto al suelo de la vesícula del prosencefalo que contiene las placodas hipofisiales que darán eventualmente lugar a los lóbulos anterior e intermedio de la pituitaria⁷.

El estadio de tres vesículas que aparecía el día anterior continua su maduración: el prosencefalo se divide en dos: el telencefalo y el diencefalo. El romboencefalo también se divide en dos : mesencefalo y mielencefalo². Este proceso da lugar al estadio de 5 vesículas; en ratas se produce en ED-11⁷. Según otros autores, este estadio de cerebro con 5 vesículas: se produciría en ED-13⁵. Finalmente encontramos:

- Telencefalo
- Diencefalo
- Mesencefalo
- Metencefalo
- Mielencefalo

A lo largo de las etapas tempranas de este estadio de 5-vesículas la pared del tubo neural se mantiene como un epitelio pseudoestratificado que genera neuronas y células de la glia⁷. Apareciendo una capa del manto en varias áreas del tubo neural⁷.

Este estadio de 5 vesículas se corresponde con el estadio de tres flexiones o curvaturas: cefálica, pontina y cervical².

Las características mas claras de la lamina neural están claramente establecidas: hay un extremo rostral mas amplio que corresponde con el

cerebro, mientras que hay un extremo caudal mas estrecho que corresponde al cordón espinal⁷.

Pudiéndose observar tres tipos de características espaciales⁷:

- Polaridad: rostro-caudal
- Simetría bilateral: Línea media
- Regionalización: 5-vesículas

ESTADIO 3-VESICULAS	ESTADIO 5-VESICULAS	SISTEMA VENTRICULAR	DERIVADOS MADUROS (ADULTO)	FUNCIONES
1. Prosencéfalo	1.1 Telencefalo 1.2 diencéfalo	Ventrículos laterales I, II. Tercer ventrículo	Bulbo olfatorio. Hipocampo, amígdala Corteza cerebral, ganglios basales, Retina, nervio óptico y sus tractos. Epitálamo Tálamo, Hipotálamo,	Olfato Almacenamiento de memoria y aprendizaje. Asociación Control motor Visión Glándula pineal Estadio de relevo para neuronas auditivas y visuales Regulación de la temperatura, sueño y respiración
2. Mesencéfalo	2. Mesencéfalo	Acueducto cerebral de Silvio.	Mesencéfalo	Tractos de fibras entre la zona anterior y posterior, lóbulos ópticos y el tectum.
3. Rombo-encéfalo	3.1 Metencéfalo 3.2 mielencéfalo	Cuarto ventrículo	Cerebelo Puente	Coordinación de los movimientos musculares complejos. Tractos de fibras entre cerebelo y cerebro
4. Parte caudal tubo neural	4. Parte caudal del tubo neural	Canal medular central	Médula espinal	Centro de control de la actividad refleja involuntaria

Figura 1.2.1. Traducido y modificado de Kandel² y Gilbert³

Justo después de que el estadio de las 5-vesículas haya comenzado se inicia la diferenciación de la glía radial y las neuronas ⁷.

A nivel del diencefalo recién diferenciado, se observa la formación de la capa del manto, en la línea media entre el presunto quiasma óptico y la eminencia media, en el área retroquiasmática y avanza rápidamente en dirección dorso-caudal hacia el presunto tálamo⁷. Aun así existe bastante controversia y falta de comprensión del proceso global sobre el desarrollo de este área, ya que la pared simple del tubo neural a esta altura se transforma en el tálamo adulto⁷.

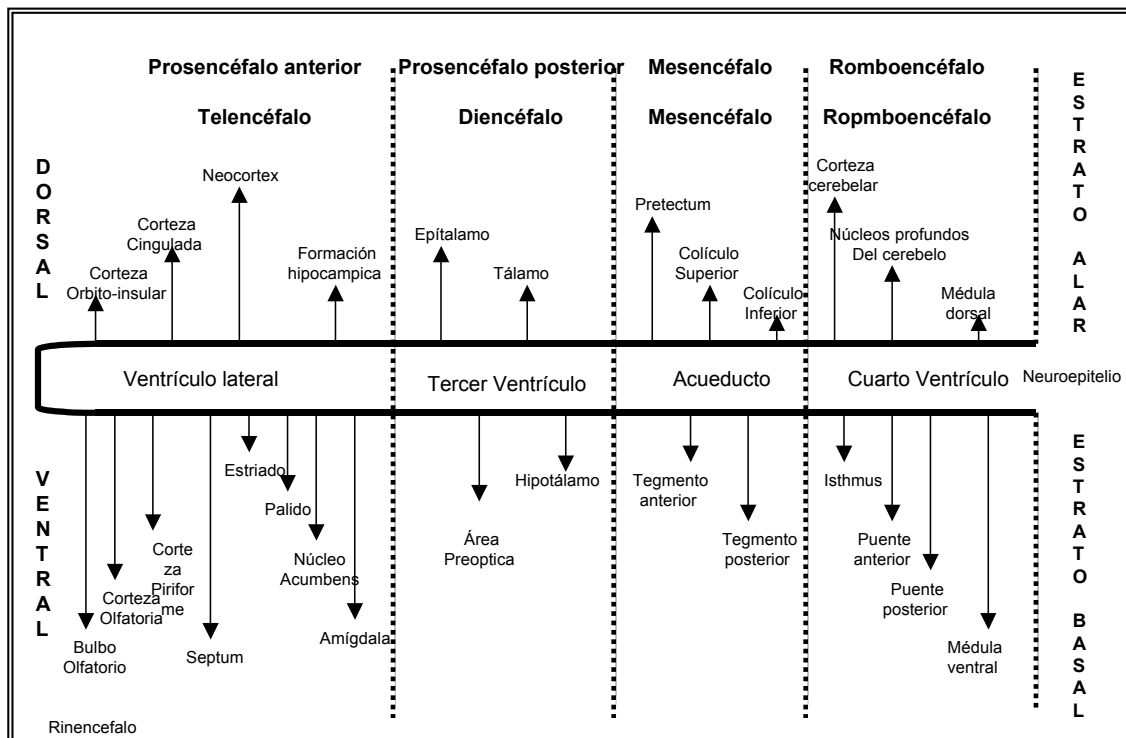


Figura 1.2.2. Traducido y modificado de Altman y Bayer.⁶

Continuando con los estudios de marcaje radiactivo y posterior disociación de células se observa la aparición de una oleada de células en ED-11⁷ que

presenta un ciclo celular medio de 9 horas y que va expandiéndose hasta llegar a un total de 5×10^7 células en ED-22, neocorticales⁹. En ED-11 comienzan a formarse las células Cajal-Retzius en la zona ventricular⁵. Las placodas que se diferencian del ectodermo somático comienzan a aparecer en ED-11⁷.

ED-12: 13-28 somitas: Longitud C-R 4.5 mm¹

En ED-12 termina de cerrarse el tubo neural⁵, aunque como hemos visto anteriormente, hay autores que ubican este hito en ED-11^{6,7}. Los dos tercios inferiores del tubo neural van a dar lugar a la medula espinal, mientras que el tercio superior formará el cerebro². En ratas la corticogénesis comienza en ED-12 y termina en PND-1 o PND-2^{12, 13, 14}.

En ED-12 el crecimiento del infundíbulo produce una indentación en el apex de la placoda hipofisial y la definitiva bolsa de Rathke es visible. La bolsa de Rathke está rodeada de ectodermo somático que forma la epidermis del techo de la cavidad oral⁷.

En ED-12 los dos componentes del prosencéfalo –el diencéfalo y el telencéfalo– aun no se pueden distinguir, pero si consideramos el prosencéfalo en su conjunto entre ED-12 y ED-21 va aumentar constantemente su volumen debido a la generación, diferenciación y maduración de las neuronas y de las células de la glia. Tenemos que hacer una especial mención en el cambio de tamaño del conjunto al papel que juegan los ventrículos, el neuroepitelio y el parénquima durante todo este periodo¹⁵.

A nivel diencefálico en ED-12 parece el surco de la habérnula, y ya en ese momento se pueden reconocer las 4 regiones longitudinales clásicas diencefálicas: epitálamo, tálamo dorsal, tálamo ventral e hipotálamo⁷.

En ED-12 es cuando la región de los núcleos basales se puede distinguir del área cortical dorsal por un leve surco corticoestriatal, dividiendo la región basal en cuatro eminencias: la estriatal (dorsal), la palial (ventral), la septal (rostral) y la amigdalal (caudal)⁷. Del resto de la secuencia de sucesos que nos llevan a la formación de los núcleos de la base en el animal adulto se comprende poco, aunque hay evidencias que sugieren que hay dos grandes oleadas de neurogénesis⁷. La primera contiene células más grandes y superficiales y genera el sistema magnocelular basal -que incluye la sustancia innominata y el complejo de la banda medial septal-diagonal, el globo pálido, el núcleo de la estria terminalis, núcleo amigdalal central, núcleo amigdalal cortico medial-. La segunda oleada contiene neuronas más pequeñas y más profundas y dan lugar a estructuras como el estriado, el tubérculo olfatorio, el núcleo lateral septal y el complejo amigdalal basolateral⁷.

En ED-12 la vesícula prosencefálica se divide en las vesículas: telencéfalo y diencefalo. La región preóptica está situada de forma caudal al surco hemisférico externo y en la zona rostral al surco óptico o interno, esta topología ha llevado a la eterna controversia sobre si la región preóptica es telencefálica o diencefálica, aunque cada vez hay más datos que apoyan la hipótesis diencefálica⁷. El área preóptica presenta un gradiente neurogénico de orientación lateromedial, con momentos diferentes en la producción de células, siendo las primeras en hacerlo entre ED-12 y ED-15 las del área preóptica lateral¹⁶.

Los principios básicos de neurogénesis cortical son similares en todos los mamíferos: las neuronas y la glía que eventualmente formaran el cortex se originan en un neuroepitelio proliferativo pseudoestratificado que tapiza el prosencéfalo¹⁷. Las neuronas del cerebro están organizadas en capas denominadas cortices y en grupos denominados núcleos³. Las capas del cortex cerebral de los mamíferos provienen de una estructura transitoria denominada estrato cortical. Las neuronas generadas abandonan la zona ventricular y se

colocan en el estrato cortical siguiendo una secuencia “desde dentro hacia fuera”, después de que un grupo de neuronas generadas se hayan situado en su lugar en el estrato cortical, los sucesivos grupos u oleadas de nuevas neuronas llegan y ocupan progresivamente posiciones mas superficiales¹⁸. Las neuronas generadas siguen a las células de glía radial hasta su posición final^{17, 19} ya sea por migración radial¹⁷ que son la mayoría, aunque se calcula que hay un 12% aproximado que lo hacen de forma lateral³ o tangencialmente²⁰. Otros autores dan otras cifras afirmando que el 80% de las neuronas corticales migran sobre la glía radial frente a un 20% de neuronas corticales que migran tangencialmente¹². Además otros estudios ponen de manifiesto que las neuronas también migran por factores ambientales – tanto factores de crecimiento como otras moléculas como el GABA – que establecen gradientes y generan quimiotaxis^{21, 22}.

Sin embargo antes de la aparición de un estrato o placa cortical, un grupo de neuronas de generación temprana se constituyen en una estructura transitoria denominada “Capa plexiforme primordial”¹⁸, “Primodium plexiforme”⁵ o pre-placa³⁸, que dará lugar a la capa I y el sub-estrato, también denominado como células de la sub-placa, por la llegada de neuroblastos postmitóticos que forman el estrato cortical¹⁸. Además en ED-12, el pre-estrato cortical, comienza a crecer rápidamente y la vesícula cerebral comienza a evaginarse⁷.

A nivel citológico el estudio de las matrices germinales ponen de manifiesto que entre ED-12 y ED-15 la matriz germinal cortical consiste básicamente en un neuroepitelio primario²³. Este neuroepitelio proliferativo genera las neuronas del cortex cerebral que se asientan en el estrato cortical durante el desarrollo embrionario²⁴. El estrato cortical esta formado por diferentes capas como veremos a continuación y por tres grandes grupos de haces de fibras:

- fibras comisurales del cuerpo calloso
- fibras tálamo-corticales

- fibras corticofugales,

así como la sustancia blanca en expansión²⁴.

En ED-12 el tiempo total de un ciclo celular –síntesis de ADN y mitosis- en las células germinales de la corteza del cerebro de rata es de 11 horas, pero va aumentando paulatinamente⁵. El neocortex de una rata contiene cerca de 34 millones de neuronas⁵. Prácticamente todas las neuronas corticales se generan antes del nacimiento, con la excepción de unas pocas de la capa IV⁵. Estas neuronas corticales, se generan en su mayoría en los últimos 10 días⁵ aunque otros autores proponen que ocurre en 7 días¹⁷ de gestación. Es decir a una media de 2400 neuroblastos corticales/minuto en la segunda parte del periodo prenatal⁵, aunque la actividad mitótica no es constante en el telencéfalo. El número de neuronas corticales generadas puede ser incluso mayor si tenemos en cuenta la muerte celular normal que se produce durante este periodo⁵.

La formación del isocortex ha sido abundantemente estudiada aunque persisten algunas diferencias entre los diversos autores en la nomenclatura y en ciertos eventos. Pero podríamos decir que se inicia en ED-12⁷, con una histogénesis ventricular que durará hasta ED-20. En el estadio temprano de formación del isocortex que dura desde ED-12 hasta ED-14, se comienza a generar una zona secundaria subventricular, y en ED-12 se comienzan a generar las células Cajal-Retzius⁷. En este momento solo se observa una zona ventricular⁷.

Muchos autores coinciden en señalar que un momento crucial en el desarrollo de una neurona es su fecha de nacimiento^{3, 17, 25, 26}. Este nacimiento ocurre cuando una célula abandona definitivamente el ciclo de generación celular –neuroblasto- y se prepara para migrar. En la rata las neuronas corticales nacen durante un periodo de tiempo que va desde ED-12 hasta ED-21²⁵ y esta fecha esta relacionada con su nivel de supervivencia, según el test de Neuman-

Keul²⁵. Las neuronas generadas en ED-12 y ED-13 tienen el índice de supervivencia mas bajo de todas las neuronas corticales, ya que menos de un 20% de ellas están presentes en la corteza madura y se encuentran en la capa VIb²⁵.

Según estudios de diversos autores¹⁷, nos muestran que las neuronas corticales que se generan en estos estadios ya tienen comprometida su ubicación específica antes de comenzar la migración. La hipótesis de la unidad de la glía radial -Radik en 1988- fue propuesta sobre la base de la anatomía de las células de la glía radial sobre las que migran las neuronas corticales. La migración a lo largo de las fibras de la glía radial mantiene un alineamiento entre la zona ventricular donde se generan las neuronas y su posición final en la corteza adulta, aunque también puede haber posteriormente una dispersión tangencial¹⁷.

ED-13: 28-40 somitas : Longitud C-R 6.5 mm¹

En estudios de embriones de rata datados en ED-13, se ha analizado el neuroepitelio pre-cerebelar del romboencéfalo. El termino romboencéfalo se refiere únicamente a la porción dorsal de la médula y el puente, donde el surco neural no se fusiona, sino que el velo medular cubre el lumen romboide del cuarto ventrículo. Inicialmente el neuroepitelio del romboencéfalo consiste en un par de cabezas de puente rostrales y caudales: el neuroepitelio primario del cerebelo y el neuroepitelio primario del sistema octavo-pre-cerebelar²⁷. Las neuronas de la oliva inferior se comienzan a generar en ED-13 y continuaran en ED-14 en el neuroepitelio primario pre-cerebelar²⁸.

En ED-13 el infundibulo se ha extendido ventralmente a lo largo de la pared caudal del la bolsa de Rathke que simultáneamente se ha agrandado⁷. El

infundíbulo embrionario contiene el lóbulo neural –posterior- de la glándula pituitaria y el sistema portal hipotálamo-hipofisiario⁷.

En el estadio ED-13 en la rata, el surco diencefálico ha desaparecido y el surco hipotalámico ha cambiado dorsalmente debido a la rápida formación de la capa del manto en el hipotálamo⁷. El tálamo dorsal es la parte más tardía del diencefalo en diferenciarse y su neurogénesis se inicia en ED-13 y avanza hasta ED-16 en la rata. Sigue un gradiente “fuera-dentro” pero no se corresponde exactamente con los núcleos del individuo adulto⁷. En ED-13 el neuroepitelio talámico presenta dos divisiones: el lóbulo rostral y el lóbulo caudal²⁹. La parte central del núcleo reticular del tálamo – que podemos dividir en tres sub-núcleos: central, medial y lateral- es el componente talámico más temprano en aparecer ya que un 50% de sus neuronas son generadas en ED-13³⁰. Las células del cuerpo geniculado medial se empiezan a generar en ED-13, llegan a un pico en ED-14 y lo hacen hasta ED-15, existiendo un gradiente cronológico lateral/medial y caudo/rostral en la neurogénesis³¹. Las neuronas más tempranas de este núcleo – cerca del 20%- se producen en ED-13 para formar los grupos ventral y dorsal más lejanos lateralmente³¹.

En ED-13 comienzan a formarse las células del área preóptica medial, estas células siguen formándose hasta ED-16¹⁶.

En ED-13 comienza el proceso de la histogénesis de la corteza cerebral, por la que se formarán los hemisferios cerebrales a partir de la pared de la vesícula telencefálica. Todo este proceso se podría resumir en varios pasos que se van a producir en los días sucesivos³⁸:

1. Capa de neuroblastos, células proliferativas que se dividen.
2. Neuroblastos abandonan el ciclo celular y se convierten en “neuronas corticales”.

3. Las primeras neuronas migran una corta distancia y se sitúan bajo la superficie de la pia madre y dan lugar a la “pre-placa” o pre-estrato.
4. La pre-placa se diferencia en dos zonas: La zona marginal que da lugar a las células de Cajal-Retzius es decir la capa I de la corteza madura; la células de la sub-placa o sub-estrato.
5. Acumulación de las células en la sub-placa o sub-estrato transformándose en la placa cortical o estrato cortical, también denominada capa plexiforme primordial.
6. La corteza en desarrollo presenta 4 capas diferenciadas:
 - Zona marginal: Células de Cajal-Retzius
 - Placa cortical o estrato cortical
 - Zona intermedia
 - Zona ventricular
7. La placa cortical se engrosa, formando las capas corticales, por las células que migran desde la zona ventricular en un patrón “dentro-fuera”.

La pared neural del telencéfalo comienza a perder su estructura homogénea⁵. El PP -primodium plexiforme o pre-estrato- comienza a formarse en la parte lateral de la pared neural del telencéfalo que bordea el estriado y el paleocortex que está formándose⁵. Las células del PP tienen formas diferentes de las de la zona ventricular⁵. Entre las células del PP están las que darán lugar a las células Cajal-Retzius y las células polimórficas. Las células Cajal-Retzius que comenzaron a formarse en ED-11 en la zona ventricular, alcanzan un punto máximo en su formación en estos momentos. Las células del estrato cortical, que serán visibles en ED-15, se empiezan a generar en ED-13⁵. En ED-13 la capa del manto se diferencia considerablemente⁷. En ED-13 el neuroepitelio se ve claramente como una capa ventricular y una capa marginal⁷.

Como hemos visto anteriormente los neuroblastos generados en las zonas ventriculares germinales migran hacia sus destinos finales a lo largo de glía radial, pero también hay evidencias que sugieren la existencia de factores

ambientales que influyen y señalizan estos movimientos, in-vivo el factor de crecimiento nervioso –NGF en sus siglas en inglés- y el GABA se co-localizan cerca de las dianas²¹. En estudios in-vitro se observa que células de ED-12 no se ven afectadas, mientras que células disociadas de la zona ventral de la medula espinal de ED-13 responden todas al efecto de químio-atracción o imán ejercido por el GABA, no así las células de la zona dorsal que no son estimuladas en su movilidad por el GABA²¹.

ED-14: 40-48 somitas. Longitud C-R 8.5 mm¹.

En ED-14 se generan las primeras las primeras células en el primodium cerebeloso³². Este neuroepitelio que formará el cerebelo, está delineado por dos claras marcas en la zona ventricular:

- La extensión anterior de la tela coroidea del IV ventrículo
- La fisura cerebelar embrionaria

Este primodium cerebeloso se puede dividir en tres partes: el primodium cerebeloso lateral que cubre el receso lateral del IV ventrículo, el primodium cerebeloso subismal que se encuentra situado detrás del istmo y el primodium cerebeloso postistmal que recubre el receso postistmal del IV ventrículo^{14, 32}. Las primeras células generadas lo hacen en la zona transitoria superficial³². Las células de Purkinje de rata provienen del primodio del cuarto ventrículo y se generan entre ED-14 y ED-15³³.

En ED-14 la bolsa de Rathke se separa del ectodermo somático para formar una vesícula, el lóbulo anterior de la pituitaria se ha comenzado a diferenciar, con la separación de las presumibles regiones tirotropas, corticotropas y gonadotropas⁷.

En ED-14 el lóbulo rostral del neuroepitelio talámico se ha dividido en dos partes: el lóbulo anterior y el lóbulo reticular; el lóbulo caudal a su vez se divide en el lóbulo intermedio y el lóbulo posterior²⁹. En ED-14 se distinguen los cuerpos geniculados dorsales, laterales y mediales a este nivel del metatálamo⁷. Las neuronas del núcleo lateral dorsal del tálamo se generan en un periodo de 3 días entre ED-14 y ED-16, y su patrón de asentamiento muestra un gradiente combinado: lateral/medial y dorsal/ventral³⁴. Un 40% de las neuronas del subnúcleo central del núcleo reticular del tálamo se generan en ED-14³⁰. El grueso de las neuronas del complejo nuclear ventral del tálamo se producen entre ED-14 y ED-16, aunque existen diferencias entre sus tres núcleos; el núcleo ventrobasal es el más antiguo, el núcleo ventrolateral es el siguiente y el núcleo ventromedial aparece el último³⁵.

En ED-14 comienza a aparecer una capa del manto hipocampal y continuará desarrollándose en ED-15⁷. Las tres capas del hipocampo se forman siguiendo un patrón “dentro-fuera”⁷. En este estadio la capa del manto no está plegada, pero una incipiente fisura hipocámpica marca la frontera entre el giro dentado y el Cuerno de Ammon⁷. Las neuronas del giro dentado de la capa 3 son las primeras en ser generadas. En este estadio la pared del tubo neural en esta región presenta una capa ventricular, una capa intermedia y una capa denominada pre-estrato⁷.

En ED-14 ya es visible el nervio óptico³⁶, pero su estimulación no genera ninguna respuesta³⁶. Aunque las hendiduras, los pedúnculos y las copas ópticas se diferencian bastante pronto, como veíamos anteriormente en ED-9, la neurogénesis de las copas ópticas no comienzan hasta ED-14 en la rata⁷.

En ED-14 se generan las neuronas del núcleo preóptico medial, y continuarán formándose hasta ED-17¹⁶.

Las células del núcleo endopiriforme se generan en ED-14 y continúan en ED-15 formando un gradiente muy fuerte en dirección vertical donde en la parte ventral se encuentran las células mas antiguas y en la parte dorsal las mas jóvenes³⁷. Se postula que las neuronas endopiriformes se generan en el ángulo paliostriatal ventricular, el neuroepitelio que forma una cuña entre el primodio del neocortex y los ganglios basales³⁷.

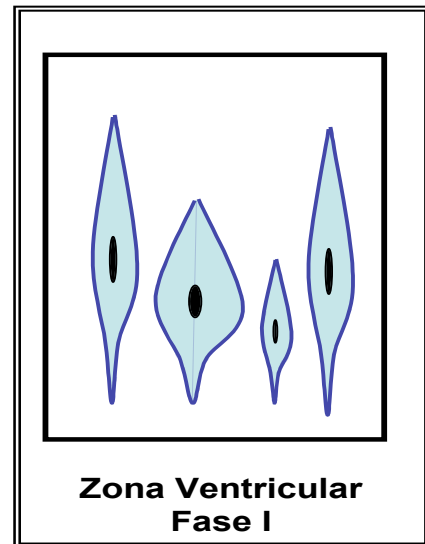


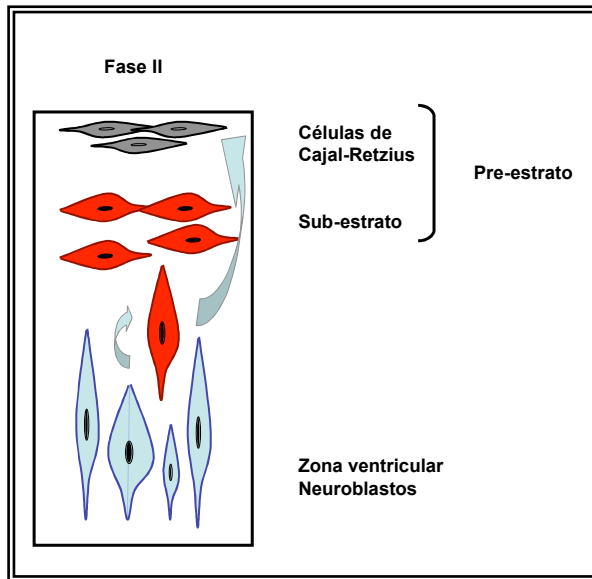
Figura 1.2.3³⁸

Como veíamos anteriormente, en la formación del isocortex, ED-14 marca el final del estadio temprano, cuando se está formando una zona secundaria subventricular y el sub-estrato⁷. En ED-14, aparece una incipiente capa del manto ó pre-estrato cortical que se diferencia rápidamente y que esta separada de la capa ventricular por una incipiente capa intermedia⁷.

Observándose las siguientes capas^{3, 7, ;}:

- Capa de la pre-placa o pre-estrato: Capa I
 Capa VI b
- Capa intermedia
- Ventricular

El desarrollo de la capa I y del subestrato del neocortex de rata se ha estudiado con marcaje radiactivo. Aparecen generadas principalmente en ED-15 las presuntas células de Cajal-Retzius, así como las células del subestrato³⁹, siendo estas dos poblaciones previas al estrato cortical. Las células de Cajal-Retzius se colocan siempre en las posiciones mas superficiales a lo largo de todo el proceso de corticogénesis³⁹.



Las células del subestrato cortical, son una población transitoria ya que el 50% de ellas mueren entre PND-0 y PND-40⁴⁰. Algunas células del sub-estrato son generadas antes de ED-15, en ED-14 y estas pertenecen al sub-estrato occipital⁴⁰.

Figura 1.2.4³⁸

ED-15: 48-58 somitas Longitud C-R 11.0 mm¹.

Estudios de embriología comportamental muestran respuestas reflejas motoras en medula espinal de rata en ED-15, estos reflejos espinales son consistentes con la aparición de conexiones tempranas de las neuronas de las raíces de los ganglios dorsales⁴¹.

Además observamos que los neuroblastos espinales ventrales que migraban en estudios in-vitro, en ED-13 para ED-15 declinan en su migración hacia el GABA, mientras que en ED-15 hay un aumento de la migración de neuroblastos dorsales en respuesta al NGF²¹.

En ED-15 las neuronas de la oliva que se habían generado más tardíamente en ED-14, se traslocan hacia la zona premigratoria de la oliva inferior²⁸. Las neuronas del núcleo reticular lateral y del núcleo cuneado externo, se originan en el neuroepitelio pre-cerebelar primario, en el mismo sitio que las células de la oliva inferior, pero siguen una ruta de migración diferente⁴², siendo la

primeras células generadas en ED-15 las cuales representan al menos un tercio del total; estas células se unen al torrente migratorio pre-cerebelar posterior extramural⁴², estas células se mueven circularmente sobre la pared de la medula en dirección ventral⁴².

Las neuronas del núcleo reticular tegmental del puente se producen fundamentalmente entre ED-15 y ED-16 y derivan del neuroepitelio primario pre-cerebelar⁴³.

El neuroepitelio cerebeloso en ED-15 genera una oleada de células de la zona transitoria mas profunda³².

En ED-15 se van a generar las primeras células del núcleo periventricular - ver área preóptica- y lo seguirán haciendo hasta ED-18¹⁶.

En ED-15 se comienzan a generar las células del claustrum y lo harán durante ED-16 también formando un gradiente en dirección longitudinal donde la parte posterior es la más antigua y la parte anterior la más joven³⁷. Las neuronas del claustrum se generan del neuroepitelio neocortical³⁷.

En ED-15 los cuatro lóbulos en los que se había diferenciado el neuroepitelio talámico, se han convertido en sublóbulos, formando concavidades y convexidades en el neuroepitelio talámico, algunos de ellos son aun reconocibles en ED-16 pero van desapareciendo²⁹. Estos autores proponen que los sublóbulos que aparecen transitoriamente representan las posibles líneas celulares comprometidas con la generación temprana de los diversos núcleos talámicos posteriores²⁹. Las neuronas del núcleo anteroventral se generan en un periodo de 3 días entre ED-15 y ED-17 y se asientan siguiendo un patrón de gradiente neurogénico. oblicuo lateral/medial y ventral/dorsal³⁴. Las neuronas del núcleo anterodorsal se generan en un periodo de tres días entre ED-15 y ED-17 y muestran gradiente latero/medial³⁵. Así mismo la masa de neuronas

del núcleo paratenial se generan en un periodo de cuatro días entre ED-15 y ED-18 y se asientan con un gradiente lateral/medial³⁴. Los subnúcleos medial y lateral del núcleo reticular del tálamo se generan en ED-15 formando un gradiente latero/medial; en ED-15 se generan el 12% de las neuronas del subnúcleo lateral y cerca del 30% de las neuronas del subnúcleo medial³⁰. El cuerpo geniculado medial se produce en orden secuencial las neuronas de la cubierta lateral, intermedia y medial. La medial es la última que se genera en ED-15 con un 30% de las células producidas rostralmente y se corresponden con el subnúcleo medial –magnocelular- del geniculado medial³¹.

El hipocampo está formado por tres componentes morfogenéticos discretos: el neuroepitelio de Ammon, el neuroepitelio primario dentado y el gliopitelium de la fimbria⁴⁴. En ED-15 comienzan a producirse unas células que darán lugar al estratum radiatum y al estratum oriens⁴⁴.

En estudios con transferencia de genes a través de retrovirus en células de ED-15/ED-16 considerados estadios tempranos de la neurogénesis, se ha encontrado que la zona ventricular contiene precursores celulares separados para células piramidales y para células no-piramidales⁴⁵. Es decir esta zona ventricular no es homogénea sino que es heterogénea para las poblaciones de células precursoras de las dos grandes familias de células corticales⁴⁵.

En esta fase terminan de formarse las células Cajal-Retzius que se iniciaron en ED-11 y llegaron a su pico máximo en ED-13⁵.

El Primodium Plexiforme esta ya presente también en la pared medial del telencéfalo⁵. Este Primodium Plexiforme se separa en dos zonas: zona marginal y subestrato, por la formación del estrato cortical, que comienza en ED-15 y terminará en ED-17⁵.

Las primeras células del estrato cortical son visibles en la parte mas lateral de la corteza, al borde, junto con el estriado y el paleocortex en desarrollo⁵.

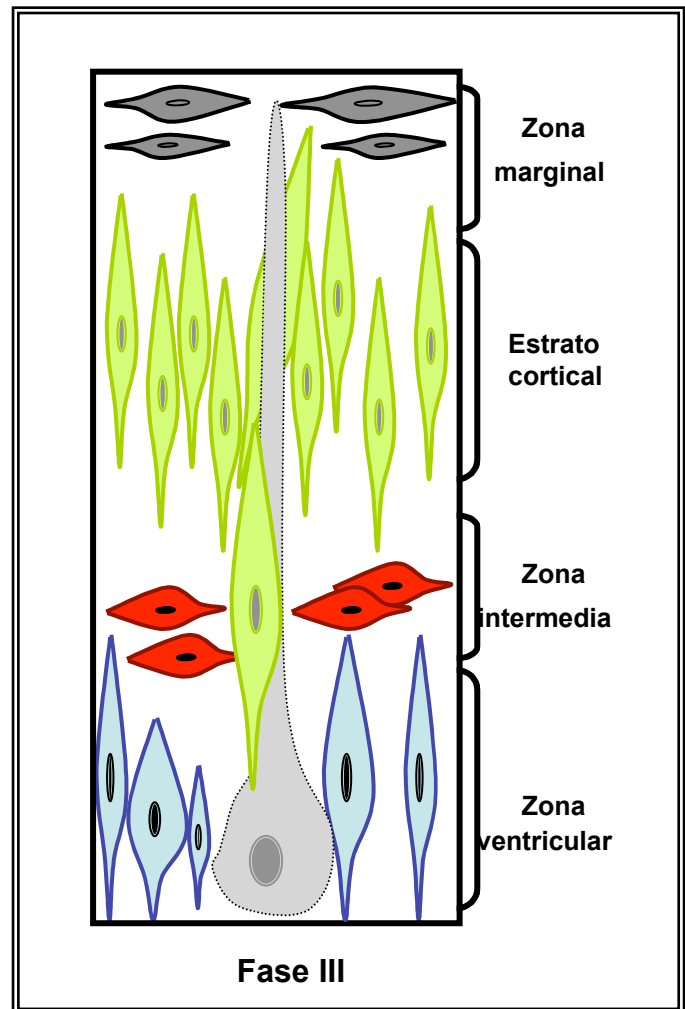
Los gradientes de desarrollo del estrato cortical son similares a los del PP⁵.

Antes de poder visualizar el estrato cortical se puede diferenciar la zona subventricular –SV- de la zona ventricular-VZ-⁵.

En ED-15 hay una mayor diferenciación de la capa del manto⁷. En este momento del desarrollo cerebral se puede observar que el eje longitudinal del cerebro esta girado de forma inusual⁷.

En la formación del isocortex, en ED-15 comienza el estadio intermedio que durará hasta ED-16⁷. En ED-15 aparece la Capa 6b⁷. Además en ED-15 aparece una capa sub-ventricular, observándose una serie de capas⁷:

Figura 1.2.5³⁸



- Capa pre-estrato: Capa I
Capa VI b
- Capa intermedia
- Capa sub-ventricular
- Capa ventricular

Las neuronas corticales generadas en ED-15 y hasta ED-18 tienen un índice de supervivencia particularmente alto ya que más de dos tercios de ellas se encuentran en la corteza del adulto y están distribuidas en las capas VI a, V y IV²⁵.

En estudios realizados con neuronas corticales nacidas en ED-15, se observa que la mayoría de ellas son generadas a una distancia de entre 400-100 micrones de su lugar de asentamiento definitivo en el estrato cortical. Para llegar allí deben migrar de forma radial o lateral. Los tiempos de llegada dependen de la ruta que sigan las neuronas: las neuronas que migran solo radialmente llegan al estrato cortical dorsal en dos días –ruta corta – mientras que las neuronas que migran lateralmente llegan al estrato cortical lateral en 3 días –ruta más larga – y en el estrato cortical ventrolateral en 4 días que es la ruta más larga de todas⁴⁶.

En estudios in-vitro con células disociadas de corteza cerebral de rata embrionaria, se observa que la migración neuronal inducida por GABA es dependiente de la edad y de la dosis²². Detectándose por primera vez en ED-15, aunque también puede observarse en ED-16 y ED-18. La dosis de GABA en el rango femtomolar, genera quimiotaxis, es decir migración dirigida a un gradiente, mientras que las concentraciones en el rango de pico y micromolar generan quimiocinesis es decir movilidad al azar, como ya dijimos en la introducción, en otras funciones en las que está implicado el GABA²².

ED-16: 58-65 somitas Longitud C-R 13.5 mm¹.

Las células de medula espinal dorsal responden a la quimiotaxis de NGF y del GABA mostrando un pico en este estadio de ED-16 y declina a partir de este día²¹, y a partir de ED-17 no aparece movilidad en ninguna de las células estudiadas de medula espinal. Estos resultados indican que las respuestas migratorias de las células disociadas de medula espinal presentan un gradiente de migración ventral-dorsal en momentos tempranos de la gestación a moléculas como el GABA y el NGF²¹.

En ED-16 las células de la oliva inferior se unen al torrente migratorio de la oliva que sigue una ruta entre la sustancia gris y la sustancia blanca de la médula²⁸.

El neuroepitelio cerebeloso, en ED-16 la zona nuclear transitoria se divide en 2 componentes: uno transversalmente orientado que presumiblemente dará origen al haz de fibras de Rusell, y otro longitudinalmente orientado que dará fibras del pedúnculo superior ipsilateral cerebeloso³². La migración de los neuroblastos de cerebelo se ha estudiado⁴⁷ y se ha observado que además de migrar sobre la glía y la matriz extracelular también lo hacen sobre axones preexistentes⁴⁷.

El neuroepitelio de Ammon comienza a generar células en ED-16 y lo hará hasta ED-19⁴⁴. Sobre estas células se forma una banda difusa de células que se habían generado en ED-15 y que se consideran el estratum radiatum y el estratum oriens⁴⁴. Es en este periodo de ED-16 y ED-17 cuando el primordio del hipocampo se desarrolla desde la pared dorsomedial del telencéfalo, en este estadio los límites están señalados por un estrechamiento de la zona ventricular y un ensanchamiento de la zona marginal⁴⁸.

En ED-16 si estimulamos el nervio óptico, que había aparecido en ED-14, observamos que se detecta respuesta en el colículo superior³⁶.

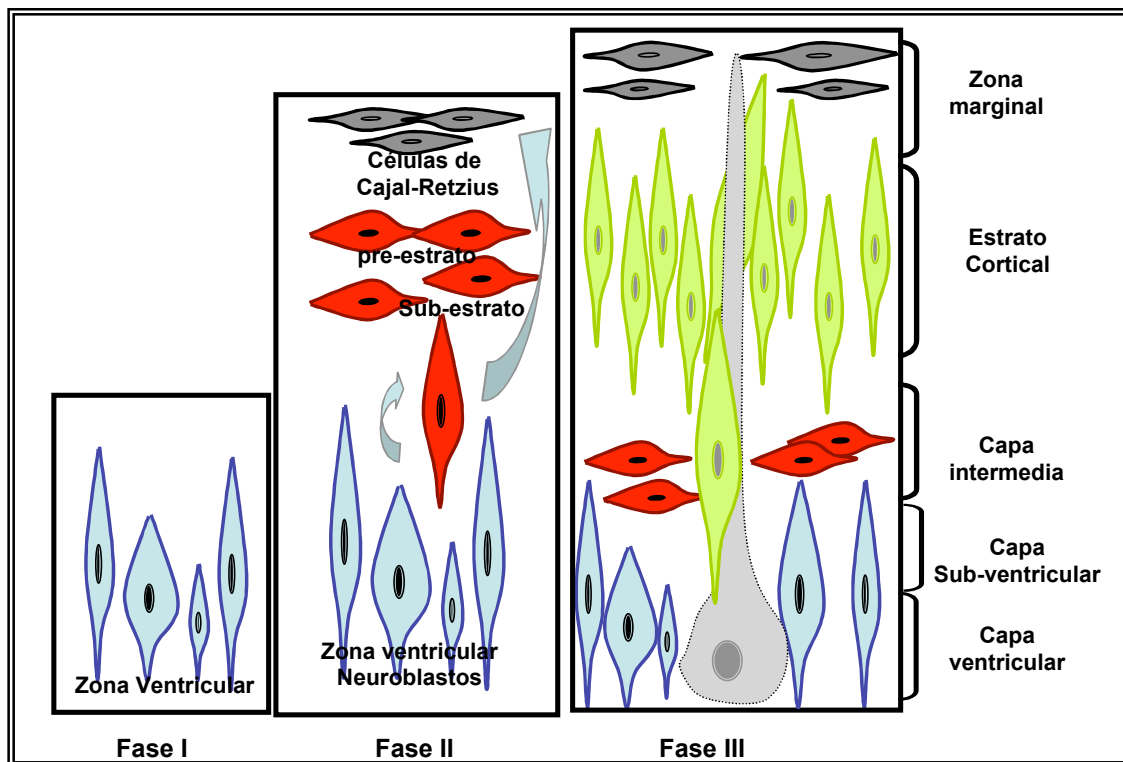
La masa de neuronas del núcleo anteromedial del tálamo se producen en un periodo de dos días entre ED-16 y ED-17 y muestra el mismo patrón de asentamiento que el núcleo anteroventral³⁴. Las neuronas del núcleo paraventricular en su parte central se producen en un periodo de dos días entre ED-16 y ED-17 y con un patrón ventral/dorsal³⁴.

Hay un pico en la génesis de células del estrato cortical entre ED-16 y ED-17⁵. En la formación del isocortex ED-16 está incluido en el periodo intermedio,

apareciendo la capa V⁷. En ED-16 aparece el patrón de capas que se va mantener básicamente a lo largo del periodo perinatal, observándose las siguientes capas⁷:

- Capa I
- Capa del estrato cortical
- Capa del sub-estrato que se convierte en VI b en el adulto
- Capa intermedia
- Capa sub-ventricular
- Capa ventricular

Figura 1.2.6.³⁸



ED-17 Longitud C-R 16.5 mm¹.

En ED-17 el torrente migratorio de la oliva se reduce a una pequeña banda cerca del cuerpo de la oliva inferior, que se ha asentado en este momento por neuronas que fueron generadas en ED-13²⁸.

En ED-17 el torrente de células migratorias precerebelar posterior extramural alcanza la línea media y la cruza por debajo de la oliva inferior⁴².

Para ED-17 la silueta general del cerebro en desarrollo representa bastante bien la que tendrá en el adulto, excepto por el cerebelo que es más pequeño⁷.

A nivel de la glándula pituitaria otra región del lóbulo anterior se diferencia para dar lugar a las regiones somatotropas y lactotropas⁷. La disposición general de la glándula pituitaria en conjunto, se asemeja a la que se observa en el animal adulto⁷.

En el área prospectiva del hipocampo se puede visualizar una fisura hipocámpica, con un rápido crecimiento del giro dentado⁷. El neuroepitelio dentado primario se diferencia del neuroepitelio de Ammon por su localización y por presentar menos células⁴⁴. La presumible capa ventricular del giro dentado esta situada adyacente a la lamina epitelial que contiene la incipiente fimbria⁷. El gliopitelio de la fimbria esta situado entre el neuroepitelio primario dentado y la punta del rudimento hipocampal⁴⁴. En este estadio la pared del tubo neural en este área contiene una capa ventricular, una capa intermedia, el estrato cortical y la capa molecular⁷. A partir de esta diferenciación en el desarrollo del hipocampo va a progresar siguiendo esta geometría básica⁷. Además en ED-17 se comienzan a generar células del Cuerno de Ammon⁴⁴.

La masa de células del núcleo paraventricular del tálamo en su parte lateral se forman en un periodo de dos días entre ED-17 y ED-18 con un gradiente ventral / dorsal³⁴.

En la formación del isocortex en ED-17 comienza una histogénesis sub-ventricular que durará hasta ED-20⁷. Termina de formarse el estrato cortical⁵. Las células del estrato cortical son visibles en la pared medial del telencéfalo⁵.

Las células del estrato cortical generadas en la zona subventricular migran dentro del estrato cortical a una velocidad estimada de 15-30µm/hora⁵. Según numerosos estudios, las células generadas primero se depositan en las capas mas bajas del estrato cortical, mientras que aquellas generadas más tarde se depositan en las capas mas superficiales, en el clásico patrón dentro-fuera⁵. Esto es así en general con la excepción de las células Cajal-Retzius⁵. Existe cierto grado de desacuerdo entre diversos autores, con el patrón de génesis de las neuronas no-piramidales⁵. Parece que existen dos opciones posibles: Opción A, la posición de las neuronas no-piramidales no esta relacionada con sus fecha de generación y están difusamente distribuidas por todas las capas corticales⁵. Opción B, las neuronas no-piramidales son generadas según un patrón dentro-fuera clásico⁵.

Siguiendo con la formación del isocortex, en ED-17 da comienzo el estadio tardío, que durará hasta ED-18⁷. En ED-17 se diferencian claramente la capa IV y el inicio de las capas II/III⁷. Observándose las siguientes capas⁷:

- Capa I
- Capa del sub-estrato que dará lugar a la capa VI b
- Estrato cortical
- Capa intermedia
- Capa sub-ventricular
- Capa ventricular

ED-18 Longitud C-R 20.5 mm¹.

En ED-18 comienzan a ser reconocibles la segregación regional de las neuronas que forman la divisiones de la oliva inferior²⁸.

Las neuronas del núcleo reticular del tegmento pontino generadas en ED-15 y ED-16 que comenzaron a migrar en ED-18 llegan al polo anterior del puente, están neuronas han migrado en una secuencia temporal ordenada formando un gradiente posterodorsal hacia anteroventral en el núcleo reticular del tegmento pontis⁴³.

En ED-18 sigue la diferenciación de los grupos de células del tálamo dorsal, excepto los del metatálamo que se habían producido en ED-14, de forma tardía y durará hasta ED-20⁷.

En este momento las principales estructuras del hipocampo ya son reconocibles en secciones horizontales⁴⁸. En ED-18 se comienza a formar una densa capa de células que corresponden a un incipiente estrato piramidal del hipocampo y se puede trazar una banda de migración desde el neuroepitelio de Ammon. Esta banda de migración aumenta su tamaño durante varios días y finalmente declina y desaparece en ED-22. Las células de esta banda son las células del Cuerno de Ammon que se producen entre ED-17 y ED-20⁴⁴. En ED-18 un reducido neuroepitelio primario dentado es rodeado por un agregado de células proliferativas que dan lugar al neuroepitelio secundario; posteriormente aparecerá un neuroepitelio terciario que es muy activo peri y postnatalmente⁴⁴. En este momento el área dentada consiste en una rica zona germinal⁴⁸.

En estos momentos el tiempo de duración de un ciclo celular completo en corteza – desde la síntesis de ADN y la mitosis- es de 19 horas⁵.

En la formación del isocortex ED-18 pertenece al estadio tardío que se había iniciado en ED-17, y en este momento se observan claramente el epéndimo y los progenitores glias⁷. Se observa la siguiente ordenación en las capas⁷:

- Capa I
- Capa del sub-estrato: Capa VI b

- Capa intermedia: Zona superficial
Zona profunda.
- Capa subventricular
- Capa ventricular

La capa intermedia: su zona superficial y profunda se distinguen mejor⁷. El estrato cortical observamos como se va engrosando a lo largo del desarrollo⁷. En ED-18 nacen las neuronas que estarán localizadas en la capa III y IV⁴⁰.

ED-19 Longitud 25.5 mm¹.

En ED-19 son perfectamente reconocibles las cuatro zonas o divisiones más importantes de la oliva inferior: oliva posterodorsal, oliva anterolateral, oliva posteroventral y oliva anteroventral²⁸. Un grupo de las células del torrente migratorio pre-cerebelar posterior extramural comienzan a formar una condensación ventrolateral extramural⁴² que dará lugar al núcleo reticulado lateral. Otro componente de este torrente migratorio que continúa dorsalmente y forma una condensación ED-19 será el nucleón cuneado externo⁴².

En la formación del isocortex, desde ED-19 en adelante se observa una gliogénesis difusa⁷.

Analizando el índice de supervivencia de las neuronas, vemos que las neuronas generadas entre ED-19 y ED-21 tienen un índice de supervivencia bajo, comparado con el grupo anterior, es decir el que se generaba entre ED-15 y ED-18, y se distribuyen en las capas II y III²⁵.

ED-20 Longitud 30.0 mm¹.

En estudios de desarrollo de cerebelo de rata en ED-20 se observa por primera vez la fisura separando el futuro lóbulo inferior en el vermis y el flóculo en los hemisferios⁴⁹.

En ED-20 algunas de las células que se habían asentado en ED-19 formando una condensación ventrolateral extramural comienzan a penetrar el parenquima y se establecen como neuronas del núcleo reticular lateral⁴²; este proceso de penetración continuará paulatinamente hasta que en ED-22 todas las células de este núcleo hayan penetrado el parénquima⁴².

En ED-20 termina la diferenciación de grupos de células del tálamo dorsal⁷.

Desde ED-18 en el hipocampo la zona ventricular y la zona intermedia ha ido desapareciendo quedando reducidas en ED-20 a una capa celular, sin embargo a partir de ED-20 la capa piramidal se engrosa y se hace mas prominente⁴⁸.

ED-21 Longitud 35.0 mm¹

En el desarrollo del cerebelo en ED-21 aparecen tres fisuras más y se empieza a detectar una corteza cerebeloso en 5 lóbulos: anterobasal, anterodorsal, central, posterior e inferior⁴⁹. Desde ED-21 hasta la madurez, en PND-20, las fisuras se van haciendo más profundas y generándose los lóbulos⁴⁹. Durante este proceso de lobulación, las neuronas profundas están migrando desde la superficie hacia las zonas profundas del primodium cerebeloso y grupos de células de Purkinje están migrando desde una zona de estancia fuera del neuroepitelio cerebeloso hacia la superficie cortical⁴⁹.

En la formación del isocortex en este momento se produce una diferenciación laminar, observándose⁷:

- Capa I
- Capa VI a
- Sub-estrato VI b

- Capa intermedia superficial
- Capa intermedia profunda
- Cal
- Capa sub-ventricular
- Epéndima

Como es generalmente aceptado las neuronas del estrato cortical son generadas en un patrón “dentro-fuera” de forma que las capas mas superficiales del adulto son generadas mas tarde que las mas profundas⁷. Se puede proponer un modelo de dos estadios de diferenciación cortical donde el pre-estrato aparece primero y es seguido por el estrato cortical que se sitúa en medio del pre-estrato⁷. Si esto es correcto las células de Cajal-Retzius de la capa I son las primeras neuronas generadas, las siguientes son las de la capa VI b, seguidas de VI a, V, IV,III,II, siendo las de la capa II las últimas, en generarse⁷.

ED-22 Longitud 40.5-42.6 mm¹

El ED-21 marca el final del desarrollo embrionario, siendo ED-22 el día del nacimiento de la rata. A partir de aquí los cambios postnatales que tiene lugar los veremos integrados en el capítulo de resultados.

REFERENCIAS AL APENDICE DE LA INTRODUCCIÓN:

¹ Herber R, Stromberg M. Anatomy and embriology of the laboratory rat. Asterdam: Ed BioMed Verlag; 1986.

² Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM. Principles in Neural Science. 3º ed. New York: Elsevier; 1991.

³ Gilbert SF. Developmental Biology. ed 6ª. New York: Sinauer Associates Inc, Publishers; 2000.

⁴ Nioeuwenhuys R, Donkelaar HJ, Nicholson C. The central nervous system of vertebrates. Vol 3: mamíferos. Berlin: Spronger-Verlag; 1998.

⁵ Uylings HM, Van Eden CG, Parnavelas JG, Kalsbeek A. The prenatal and postnatal development of the rat cerebral cortex. The cerebral cortex of the rat. Cambridge, MA: MIT Press; 1990.

⁶ Altman J, Bayer SA. Atlas of Prenatal Rat Brain development. Florida: CRC Press; 1995.

- ⁷ Alvarez-Bolado G, Swanson LW. Developmental brain maps: Structure of the embryonic rat brain. Amsterdam: Ed. Elsevier Science B.V.; 1996.
- ⁸ Gotz M, Williams BP, Bolz J, Price J. The specification of neural fate: a common precursor for neurotransmitter subtype in the rat cerebral cortex in vitro. *Eur J. neurosci.* 1995 May; 7(5):889-98.
- ⁹ Maric D, Maric I, Ma W, Lahojuji F, Somogyi R, Wen X, Sieghart W, Fristchy J.M, Barker J.L. Anatomical gradients in proliferation and differentiation of embryonic rat CNS accessed by buoyant density fractionation: $\alpha 3, \beta 3$ and $\gamma 2$ GABA-A receptor subunit co-expression by post-mitotic neocortical neurons correlates directly with cell buoyancy. *Eur J Neurosci.* 1997;(9):507-522.
- ¹⁰ Carlson NR. Fisiología de la Conducta. Traducción de la 6ª ed en ingles. Barcelona: Ariel Neurociencia; Oct. 1999. Capt 2: pp 75.
- ¹¹ Miao N, Wang M, Ott JA, Dálessandro JS, Woolf TM, Bumcrot DA, Mahanthappa NK, Pang K. Sonic hedgehog promotes the survival of spscific CNS neuron populations and protects these cells from toxic insult in vitro. *J Neurosci.* 1997 Aug; 17(15): 5891-5899.
- ¹² Berbel P. Las hormonas de la inteligencia. *Mente y Cerebro* nº 2- 2003: 10-20.
- ¹³ Götz M. Getting there and being there in the cerebral cortex. Basilea: Experientia, Birkhäuser Verlag; 51: 301-316. 1995.
- ¹⁴ Cajal SR. Histogénesis de la corteza cerebral. Capitulo XLVII. En *Histología de sistema nervioso*. Alicante: Editado por el Instituto de Neurociencias Universidad de Alicante. 1992.
- ¹⁵ Bayer SA, Zhang X, Russo RJ, Altman J. Three-dimensional reconstructions of the developing forebrain in rat embryos. *Neuroimage.* 1994 Nov;1(4):296-307.
- ¹⁶ Bayer SA, Altman J. Development of the preoptic area: time and site of origin, migratory routes and settling patterns of its neurons. *J. com neurol.* 1987 Nov;265(1):65-95.
- ¹⁷ Blakemore C. Introduccion : mysteries in the making of the cerebral cortex. *Development of the cerebral cortex. Proceedings in Ciba Foundation Symposium*; 1995. John Welwy & so. 1995
- ¹⁸ Cobas A, Fairén A, Alvarez-Bolado G, Sanchez MP. Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: A comparative study of the distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABA-A receptor. *Neurosci.* 1991;40(2).375-397.
- ¹⁹ Radik P. Developmental events leading to laminar and areal organization of the neocortex. In: Schmitt FO. Editor. *The organization of the cerebral cortex*. Cambridge , MA.: MIT Press; 1981. pp 7-28.
- ²⁰ Brown M, Keynes R, Lumsden A. *The developing brain*. Oxford: Oxford Press University; 2001.
- ²¹ Behar TN, Schaffner AE, Tran HT, Barker JL. GABA-induced motility of spinal neuroblast develops along a ventrodorsal gradient and can be mimiked by agonist of GABA-A and GABA-B receptors. *J neurosci. res.* 1995; 42: 97-108.
- ²² Behar TN, Li YX, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL. GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanism. *J neurosci.* 1996 March; 16(5): 1808-1818.
- ²³ Altman J, Bayer S. Vertical compartmentation and cellular transformations in the germinal matrices of the embryonic rat cerebral cortex. *Experimental neurology.* 1990 Jan; 107(1) : 23-35.
- ²⁴ Altman J, Bayer S. Regional differences in the stratified transitional field and the honeycomb matrix of developing human cerebral cortex. *Journal of neurocytology.* 2002 Sep; 31(8-9): 613-632.

- ²⁵ Miller MW. Relationship of the time of origin and death of neurons in rat somatosensory cortex: barrel versus septal cortex and projection versus local circuit neurons. *J com neurol.* 1995; 355:6-14.
- ²⁶ McConnell SK. Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. *Brain res rev.* 1988 Jan; 13(1): 1-23.
- ²⁷ Altman J, Bayer S. Development of precerebellar nuclei in the rat: I. The precerebellar neuroepithelium of the rhombencephalon. *J com neurol.* 1987 Mar; 257 (4): 477-489.
- ²⁸ Altman J, Bayer S. Development of precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J com neurol.* 1987 Mar; 257 (4) :490-512.
- ²⁹ Altman J, Bayer SA. Development of the rat thalamus:I. Mosaic organization of the thalamic neuroepithelium. *J com neurol.* 1988 Sep; 275(3): 346-377.
- ³⁰ Altman J, Bayer AS. Development of the rat thalamus:III. Time and site of origin and settling pattern of neurons of the reticular nucleus. *J com neurol.* 1988 Sep; 3: 4006-428.
- ³¹ Altman J, Bayer A.S. Development of the rat thalamus: V. The posterior lobule of the thalamic neuroepithelium and the time and site of origin and settling pattern of medial geniculate body. *J com neurol.* 1989 Jun;4:567-580.
- ³² Altman J, Bayer SA. Embryonic development of the rat cerebellum. I Delineation of the cerebellar primodium and early cell movements. *J com neurol.* 1985 Jan; 231(1): 1-26.
- ³³ Wisden W, Korpi ER, Bahn S. The cerebellum: a model system for studying GABA-A receptor diversity. *Neuropharmacology.* 1996; 35 (9-10): 1139-1160.
- ³⁴ Altman J, Bayer SA. Development of the rat thalamus:II. Time and site of origin and settling pattern of neurons derived from anterior lobuleof the thalamic neuroepithelium. *J com neurol.* 1988 Sep; 275(3): 378-405.
- ³⁵ Altman J, Bayer AS. Development of the rat thalamus: IV. The intermmmediate lobule of the thalamic neuroepithelium, and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the ventral nuclear complex. *J com neurol.* 1989 Jan; (4) : 543-566.
- ³⁶ Reece LJ, Lim CH. Onset of the optic nerve conduction and synaptic potentials in superior colliculus of fetal rats studied in vitro. *Brain research. Dev brain res.* 1998 Mar; 106(1-2): 25-38
- ³⁷ Bayer SA, Altman J. Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. *Neuroscience.* 1991; 45(2): 391-412.
- ³⁸ Sanes DH, Reh TA, Harris WA. *El desarrollo del sistema nervioso*". Barcelona: Ariel Neurociencia; Sep 2002.
- ³⁹ Bayer S, Altman J, Ruso RJ, Dai XF, Simmons JA. Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J com neurol.* 1991 May;307(3): 499-516.
- ⁴⁰ Robertson RT, Annis CM, Baratta J, Haraldson S, Ingeman J, Kageyama GH, Kimm E, Yu J. Do subplate nerurons comprise a transient population of cells in developing neocortex of rats?. *J com neurol.* 2000; 426(4): 632-50.
- ⁴¹ Marti E, Gibson SJ, Polak JM, Facer P, Springall DR, Van Aswegen G, Atchimson M, Koltzenburg M. *The Journal of comparative neurology.* 1997; 266: 332-359.
- ⁴² Altman J, Bayer S. Development of precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *J com neurol.* 1987 Mar; 257(4):490-512.

-
- ⁴³ Altman J, Bayer S. Development of precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. *J com neurol.* 1987 Mar; 257 (4): 529-552.
- ⁴⁴ Altman J, Bayer SA. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of the dentate granule cells. *J com neurol.* 1990 Nov; 301(3): 325-342.
- ⁴⁵ Parnavelas JG, Barfield JA, Franke E, Luskin MB. Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. *Cerebral Cortex.* 1991 Nov-Dec; 1(463-468): 1047-3211.
- ⁴⁶ Bayer S, Altman J, Ruso RJ, Dai XF, Simmons JA. Cell migration in the rat embryonic neocortex. *J com neurol.* 1991 May; 307(3): 499-516.
- ⁴⁷ Hynes RO, Patel R, Miller RH. Migration of neuroblast along preexisting axonal tracts during prenatal cerebellar development. *J neurosci: The official journal of the society for neuroscience.* 1986 Mar; 6(3):867-876.
- ⁴⁸ Rozenberg F, Robain O, Jardin L, Ben Ari Y. Distribution of GABAergic neurons in late fetal and early postnatal rat hippocampus. *Brain res. Dev brain res.* 1989; 50 (2) : 177-87.
- ⁴⁹ Bayer SA, Altman J. Insights regarding the links between deep nuclear and Purkinje cell migrations, the development of cerebellar lobules, and cerebellar circuitry. *Neurotoxicology and Teratology.* 1998 May; 20(3) : 352.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Introducción

Dado que el objetivo de esta tesis es estudiar la significación biológica que tiene la aparición del neurotransmisor inhibidor GABA en el cerebro de rata durante el periodo de su desarrollo embrionario, nuestra estrategia se basó en dos partes claramente diferenciadas. La primera parte hace referencia a la recopilación de los datos actuales publicados sobre el GABA, para lo cual realizamos una minuciosa búsqueda de datos bibliográficos y a continuación el meta-análisis de los mismos. En segundo lugar nos planteamos la generación de gráficos o diagramas del cerebro de rata durante los distintos estadios del desarrollo embrionario que nos ayudaran a representar los datos obtenidos y poder mostrar unos resultados lo mas claros posibles respecto al tema de la tesis.

A lo largo de la historia de la humanidad en general y de la ciencia en particular, la transformación de los datos individuales, recogidos por la experiencia o por la investigación experimental, en conocimiento y sabiduría, ha supuesto un proceso continuo, fundamental en nuestra evolución histórica general, así como en la ciencia en concreto¹. Actualmente vivimos inmersos en la llamada “sociedad de la información”, y el problema es que esta en si misma no significa nada, pues solo cuando la información se transforma en conocimiento, en saber, en datos asimilados, comienza a tener validez y a ser operativa¹. Es por esto que en el capítulo de material y métodos, vamos a presentar herramientas de análisis de información, sobre datos generados por otros autores, que se han recogido, analizado, indexado e integrado en unas coordenadas espacio-temporales. Así mismo, hemos plasmado esta información, en diagramas, gráficos o mapas que nos permiten entender la significación de esta información en sus coordenadas espacio-temporales en las cuales ocurren ciertos acontecimientos biológicos.

2.2 Búsqueda bibliográfica

En esta tesis como en la mayoría de ellas, la aplicación de las nuevas tecnologías al campo de la investigación² esta dando un giro vertiginoso a nuestro trabajo, convirtiendo la búsqueda bibliográfica en una poderosísima herramienta de investigación. La llamada “*silico biología*”³, se inició con pasos titubeantes durante los años ochenta del siglo pasado, pero se ha establecido con pleno derecho, con la llegada del proyecto genoma humano. Si desde la bioinformática vamos a intentar comprender la complejidad de las ciencias de la vida - de la biología - seria sabio absorber e integrar el conocimiento y la experiencia previa desarrollada durante décadas sobre el “manejo del conocimiento”⁴, la catalogación e indexación⁵, es decir el almacenamiento de los datos o información, su integración, mapeado, búsqueda y retribución organizada⁶, en la llamada biblioteconomía.

La necesidad de crear bases de datos en el campo de la neurociencia surgió de una doble necesidad. Primero del campo de la clínica con imágenes radiológicas del orden de 100.000 radiografías al año que se comenzaron a digitalizar para ahorrar espacio⁷. Y segundo desde el campo de la investigación y la publicación de artículos científicos en revistas especializadas, donde era necesario un acceso rápido y eficaz; sirva de ejemplo “Medline”, creada por la “National Library of Medicine” o Biblioteca Nacional de Medicina, de la cual hablaremos mas adelante con detalle.

Actualmente el campo de la “Neuro-informática”, tanto en su aspecto clínico como de investigación básica, está centrado en la intersección entre las ciencias computacionales y la investigación del campo de la neurociencia, siendo un sector en amplio desarrollo y crecimiento, a muchos niveles, tanto científicos como institucionales⁸.

Además con el acceso electrónico a bases de datos remotas, somos capaces de acceder a un numero de publicaciones creciente y a su vez las revistas en

formato electrónico están permitiendo publicar gran cantidad de material que en el pasado no veía la luz⁹.

Por medios electrónicos capturamos, procesamos, almacenamos y comunicamos la información: el meta-análisis de esta información se convierte en una herramienta fundamental de todo el proceso¹⁰. De hecho en el “Human Project”, la base de datos de neurociencia – SenseLab - utiliza los metadatos, para facilitar el esquema de mantenimiento actualizado¹¹. El proceso de indexación y procesamiento de la información debe tener siempre una doble vertiente, por un lado la automática, día a día mas compleja basada en sistemas como los sistemas booleanos¹², la retribución de información con “soft-link hipertextos”¹³ o la aplicación de complejos algoritmos matemáticos¹⁴, y por otro lado la humana, que puede ser usada para realizar funciones de selección de la información¹⁵.

Pero simultáneamente, esta explosión de conocimiento, citas y referencias, ha creado enormes dificultades para los investigadores ya que para poder mantenerse al día, deben procesar un volumen creciente de información y de nueva literatura sobre un área del conocimiento determinada. Los sistemas de búsqueda electrónica en la literatura especializada y la utilización de términos cada vez mas definidos han sido algunas de las estrategias para resolver estos problemas¹⁶. Aunque siempre nos quedará la duda de los datos no capturados que hemos dejado de leer, estudiar o analizar¹⁷.

Es generalmente aceptado que las revisiones sistemáticas y el meta-análisis de la información representan el mas alto nivel de evidencia¹⁸, pero hay que realizar un diseño experimental y una búsqueda que reúna ciertos criterios de calidad, aplicar una metodología sistemática y explícita es una diferencia esencial entre las revisiones narrativas tradicionales y las revisiones actuales; otra diferencia importante es el alcance de la revisión, mientras que las revisiones tradicionales son amplias en general una revisión sistemática se enfoca en un estrecho y bien definido objetivo.

Pero ¿por qué necesitamos revisiones sistemáticas y meta-análisis?

Porque la gran cantidad de información generada necesita ser transformada en conocimiento. Estas revisiones nos permiten identificar nuevas áreas de trabajo para futuras investigaciones, generar nuevas hipótesis sobre un campo del conocimiento, y confirmar o dudar del paradigma en el cual nos estamos moviendo.

Pasos claves para realizar una revisión sistemática:

1. Preparación para revisión sistemática
2. Revisión sistemática de la literatura
3. Selección de los artículos a revisar
4. Evaluación crítica de la literatura seleccionada
5. Análisis y síntesis de los datos (cualitativa y cuantitativa)
6. Interpretación de los datos

En este trabajo el punto 5 será el capítulo de resultados y el punto 6 la discusión.

Preparación de la revisión sistemática:

La metodología de una búsqueda bibliográfica, la podemos encontrar en numerosas publicaciones, pero sirva por su claridad y actualización el trabajo la obra de Cordón García et al. Resumimos a continuación los pasos realizados en la búsqueda bibliográfica:

- **Definición de los objetivos y acotamiento del campo científico a explorar. Definición de los criterios de búsqueda, como periodo temporal a cubrir, lenguas deseadas para la recuperación de la**

información, así como el tipo de documento ya sean artículos, libros, monografías, tesis, etc.

- Desarrollo de la búsqueda con la elaboración de la ecuación de búsqueda, así como el tipo de instrumento para realizar la búsqueda, ya sea manual o automatizada.

La definición de los objetivos y el acotamiento del campo científico a explorar ha sido el objeto del capítulo primero o introducción de esta tesis, donde hemos expuesto el descubrimiento, la bioquímica, el conocimiento actual de la molécula del GABA, así como su distribución en el cerebro de individuos adultos y el desarrollo del sistema nervioso central de la rata durante su periodo embrionario.

La definición de los criterios de búsqueda fueron inicialmente muy ambiciosos, como han de serlo siempre en ciencia, pero se vieron ajustados a la disponibilidad de las bases de datos actuales que cubren un periodo temporal determinado y el uso del inglés como lengua fundamental de retribución de información.

Una vez hemos establecido los criterios de búsqueda se pasa al desarrollo de la búsqueda propiamente dicha. En esta fase debemos definir una o varias frases que contengan los conceptos que vamos a buscar y una vez establecidos determinar el tipo de instrumento de búsqueda que vamos a utilizar, ya sea manual o automatizada. Así mismo hay que elegir de los tesauros o listas de términos empleados en la base de datos, los descriptores o términos que vayamos a elegir. Una vez decididos estos términos de la búsqueda, habrá que definir cual será nuestra ecuación de búsqueda y cuales los operadores lógicos que emplearemos¹.

2.2.1. Las bases de datos en neurociencia.

Los instrumentos de búsqueda a nuestro alcance actualmente son de naturaleza fundamentalmente automatizada. Hay dos tipos fundamentales las búsquedas con WinSPIRS (Silver Plate Information Research System) y las búsquedas en Internet a través de un buscador.

Las búsquedas con WinSPRS requieren dos tipos de organizaciones: por un lado estaría el productor de la base de datos y por otro el centro que disponga de los elementos de tele-documentación por otro, en este caso la Biblioteca de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid.

La base de datos utilizada para realizar este trabajo ha sido “PubMed”, que fue Desarrollada por el “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) en la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos de Norteamérica¹⁹. En 1999 el Director de los Institutos Nacionales de Salud, propuso crear un archivo electrónico on-line, que comenzó a operar en Enero 2000 (Bloom, 2000), hasta entonces nuestras bases de datos estaban organizadas en CD por años. Es en una de sus bases de datos –Medline – donde hemos realizado nuestras búsquedas, siendo una de las mas prestigiosas y con mayor credibilidad de las usadas actualmente, tanto en neurociencia, como en otras áreas de la investigación²⁰.

Existen otras iniciativas, específicas del campo de la neurociencia que esperamos estén disponibles en breve, como es el proyecto “Visiome Environment” del gobierno japonés, donde se aúna la Neuro-informática con las herramientas de neuroimagen, para lograr integrar de una forma visual información desde el nivel molecular hasta el nivel de circuitos cerebrales, y modelos integrados de cerebro²¹.

En general existe un interés creciente en la integración de la neurociencia y la informática, en la denominada E-neurociencia²². Básicamente porque hay que hacer frente a numerosos retos que se plantean en la actualidad. Entre ellos algunos básicamente clínicos como hemos visto anteriormente pero otros

dentro del campo de la investigación de la ciencia básica. De la integración de las bases de datos neurológicas y de los entornos computacionales surgirá una nueva forma de explorar la estructura y la función del sistema nervioso, con nuevas técnicas de reconstrucción en tres dimensiones, con nuevos modelos de cuantificación o con la neuro-informática del desarrollo^{23, 24}. Y la posibilidad de compartir resultados, información e ideas, así como la posibilidad de revisar y analizar nuevos datos será siempre una buena idea en ciencia²⁵.

En nuestro campo en concreto, hay autores que han propuesto la creación de una aplicación denominada “Neuroanatomical Rat Brain Viewer” (NeuART Viewer), - aplicación de mapeado cerebral -, cuyo objetivo hubiera sido ayudar a crear un puente entre investigadores de bases de datos y de neurociencia; que es exactamente lo que hubiéramos necesitado para realizar este trabajo y que hubiera sido de gran utilidad en nuestro trabajo, a la vez que podríamos haber ayudado a incrementar sus bases datos, en una interacción dinámica de intercambio de información, que debería subyacer siempre al desarrollo científico²⁶.

2.2.2. Los descriptores de nuestra tesis.

Como la base de datos que hemos utilizado para este trabajo, nos permite la entrada de uno o varios términos denominados “palabras claves” (traducción literal de la expresión inglesa keywords) o descriptores en su denominación en castellano¹, en la caja de búsqueda o “query box”, realizando un mapeo automático de dichos términos. Estos descriptores o palabras claves se han contrastado frente al “MeSH” (Medical Subject Headings), que es la tabla de traducción de términos generales médicos. La MeSH, es la tabla de traducción usada habitualmente por las revistas y el índice de autores¹². Todos los términos o palabras claves que utiliza el MeSH son términos derivados del “Unified Medical language System”(UMLS), o utiliza términos sinónimos o traducidos del léxico en lengua inglesa¹². La tabla de traducción de revistas contiene el nombre completo de las mismas, o la abreviación MEDLINE, así

como el numero de ISSN, y esos mapas son los que se usan para localizar la búsqueda requerida¹². Finalmente el índice de autores es otra de las posibles herramientas que usa PubMed en su búsqueda¹².

El término “GABA”²⁷, se ha utilizado por ser las iniciales en ingles con las cuales se conoce al neurotransmisor -Gamma Amino Butyric Acid- sobre el cual se realiza este estudio. La hipótesis de trabajo que habíamos diseñado partía de la abundancia de estudios realizados en la excitación, y el ácido Glutámico como principal neurotransmisor excitador del SNC de mamíferos. Por el contrario, a la inhibición se le había prestado menor atención, siendo una parte fundamental del dialogo entre neuronas. Así pues centramos nuestra búsqueda en el GABA, por ser el neurotransmisor inhibidor mas importante del SNC de mamíferos.

El término “development”, se utilizó porque engloba dos periodos fundamentales, por un lado el desarrollo embrionario y por otro el periodo postnatal, hasta alcanzar la edad adulta. Era en esta ventana temporal donde queríamos centrar nuestro interés, en saber como se organizan los procesos de inhibición antes de llegar al individuo adulto.

El término “rat”, se utilizó por ser el modelo animal de investigación en vertebrados mamíferos mas utilizado. Y aunque el objetivo ultimo de la investigación en el campo de la neurociencia es comprender la estructura y la función del cerebro humano, las limitaciones éticas y practicas hacen que la rata, sea el modelo de preferencia de numerosos laboratorios. Si bien es cierto que no se pueden extrapolar los datos de una especie a otra, no es menos cierto que los procesos estudiados en neurofisiología celular son análogos entre especies, y es generalmente aceptado que según nos movemos desde seres mas simples hacia otros mas complejos a nivel evolutivo, los sistemas neurales a menudo se van añadiendo y no restando de los anteriores²⁶.

2.2.3. Elaboración de la ecuación de búsqueda.

Cuando se usa mas de una palabra clave en la búsqueda, es necesario el uso de “conectores booleanos” para generar una sintaxis,

Una vez identificados los descriptores del tesauro, la ecuación de búsqueda consiste en relacionar los diferentes términos mediante los llamados operadores lógicos Y, O, NO, para generar una sintaxis. En nuestro caso ya que vamos a trabajar en una base de datos de lengua inglesa nuestros operadores lógicos serán “AND”, “OR”, “NOT”. A estos operadores lógicos también se les denomina operadores o conectores booleanos. En el sistema booleano tradicional, grandes cantidades de documentos son procesados e indexados, las asociaciones de las palabras claves o descriptores, individuales nos permiten relacionar documentos y así poder de forma rápida y directa a la información, este proceso puede ser repetido tantas veces como sea necesario hasta lograr la información requerida. El modelo booleano de búsqueda representa un acceso global y directo a los documentos de una base de datos¹³.

En la base de datos Medline nuestro conector “Y-AND” es una palabra siempre usada en mayúsculas, leyéndose siempre en sentido izquierda derecha, además, si se introducen paréntesis junto a los descriptores se procesan como un bloque¹⁹. En nuestro trabajo concreto el operador “Y-AND” nos permite obtener un conjunto formado por la intersección de los documentos que contienen simultáneamente los términos descriptores de la ecuación de búsqueda¹.

2.2.4. Resultados de la búsqueda en la base de datos Medline.

En la búsqueda realizada se cubre el periodo que va desde 1959 hasta Enero del 2007, fecha de la realización de la ultima búsqueda. Finalmente realizamos la búsqueda bibliográfica en Medline database, de PubMed, usando fundamentalmente los siguientes descriptores:

- GABA

- Rat
- Development

Cuando introducimos los descriptores básicos en la base de datos utilizada, PubMedline²⁸, encontramos la posibilidad de limitar la búsqueda, en función de la lengua utilizada, si la búsqueda se realiza en animales de experimentación o en humanos, así como los periodos temporales que queramos estudiar. Los datos que presentamos a continuación no presentan ningún tipo de limite, ya que la propia ecuación de búsqueda ya los contiene.

- Ecuación de búsqueda: **“GABA and rat and development”**. Los resultados globales fueron de 2153 artículos indexados.
- Con la misma ecuación de búsqueda: **“GABA and rat and development”**, pero desglosando por periodos temporales:

FECHA	Nº DE ARTÍCULOS
1960-1970	Ninguno
1970-1980	69
1980-1990	415
1990-2000	1000
2000-2006	866

Realizando un gráfico podemos observar como a lo largo de los años se ha ido incrementando la producción científica en este campo a lo largo de los años.

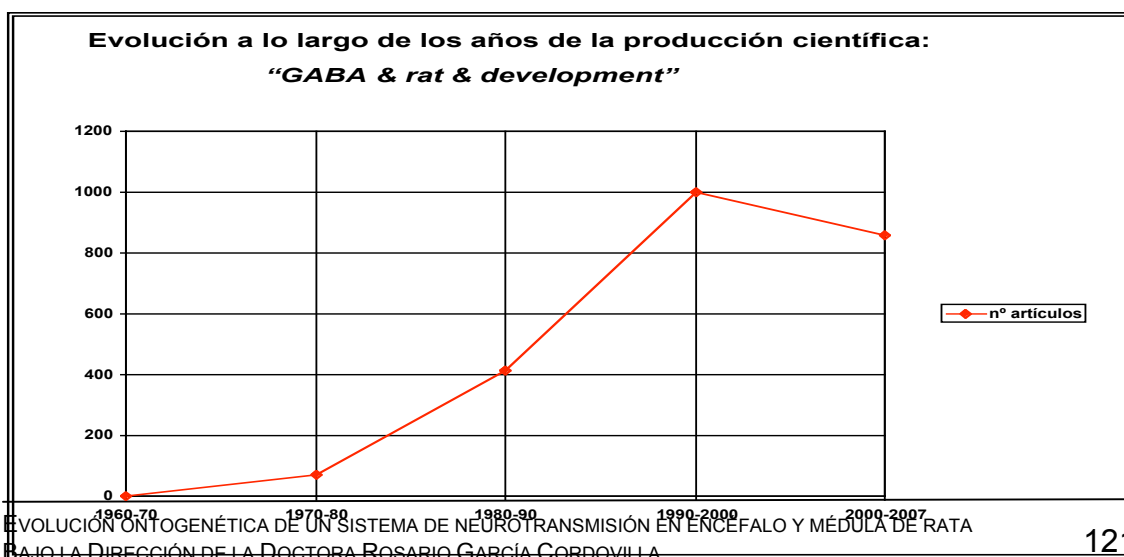


Figura 2.1.

Utilizando otros descriptores afines y elaborando otras ecuaciones de búsqueda, los resultados obtenidos fueron los siguientes (1 de Mayo del 2007):

- **“GABA and rat brain and development” : 1772**
- **“GABA and rat and prenatal”: 195**
- **“GABA and rat and embryology”: 398**
- **“GABA prenatal development rat”: 400**
- **“GABA postnatal development rat”: 842**
- **“GABAergic neurons prenatal development in rats”: 138**
- **“GABAergic neurons postnatal development in rats”: 231**

De todos los artículos, logrados con la aplicación de la ecuación de búsqueda “GABA AND Rat AND Development” a la búsqueda básica, se realizó una lectura inicial, buscando como datos concretos:

- la localización del GABA per se;
- la enzima de síntesis GAD o su mRNA;
- fechas de datación de los embriones o de los animales postnatales;
- el área, zona, grupo celular o fibras donde se localizaba.

De aquellos artículos donde aparecían estos datos se hizo un análisis mas detallado así como su traducción, si era necesario. Se descartaron todos los artículos donde se presentaban trabajos realizados exclusivamente con los receptores del GABA: GABA-A, GABA-B y GABA-C, su localización anatómica o sus coordenadas temporales, y que no presentaran otra información. Recordemos que las neuronas gabaérgicas son aquellas que liberan GABA como neurotransmisor, y que cualquier tipo de neurona, bien sea glutaminérgica, serotoninérgica e incluso gabaérgica puede presentar en su membrana receptores de GABA.

2.2.5. Resultado en la búsqueda de Internet, buscador Google

Los sistemas de búsqueda en Internet son similares a los que hemos visto anteriormente para las bases de datos: ecuación de búsqueda, operadores lógicos ó booleanos, etc. Pero es al introducir nuestra ecuación de búsqueda cuando encontramos que algunos de nuestras iniciales no son las mas adecuadas para la búsqueda en la red. Por ello hemos utilizado la técnica de las comillas para unir conceptos o separarlos, es decir si la frases son abiertas se hace una búsqueda de intersección, sin embargo si colocamos la frase entre comillas la búsqueda se hace como una única palabra, aunque esta sea compleja. En las búsquedas en el Google el operador lógico por omisión siempre es “AND”. Hemos obtenido los siguientes resultados:

Google [<http://www.google.com>]

- GABA rat development: 92.000
- “GABA rat development”: 0
- GABA rat brain development: 82.200
- GABA “rat brain” development: 43.200
- GABA rat brain embryologic development: 58
- GABA rat brain “embryologic development”: 20
- GABA rat brain “ontogenetic development”: 72
- GABA “rat brain” “ontogenetic development”: 55
- GABA rat brain prenatal development : 9.850
- GABA “rat brain” prenatal development: 5.610
- GABA rat brain “prenatal development”: 637
- GABA “rat brain” “prenatal development”: 397

Queremos hacer notar la diferencia del número de artículos en función de la situación de las comillas. Así mismo poner de manifiesto que de las búsquedas realizadas, los artículos que resultaban interesantes para este trabajo encontrados en Internet, conectaban con PubMed, para descargarlos.

2.3. Mapas cerebrales

Una vez obtenidos y analizados todos los artículos que tenían algún dato relevante para nuestro trabajo, había que crear un soporte gráfico donde apoyarlo, para ellos empezamos a trabajar en diversos modelos conceptuales.

Cuando nos planteamos plasmar en un gráfico el sistema nervioso central nos encontramos de frente con una tarea compleja, por varios motivos:

- El SNC que nosotros queremos representar pertenece a un ser vivo, y sus representaciones ideales así lo deberían presentar, pero para poder estudiarlo, se sacrifica al animal y algunas estructuras pueden cambiar cuando el animal muere²⁹. Es por ello que algunas técnicas de tratamiento de imagen actuales, resultan tan atractivas y didácticas³⁰.
- El SNC es un órgano sólido que tiene volumen, es decir 3 dimensiones en las coordenadas espaciales del eje cartesiano x, y, z. De hecho alguno de los mejores y mas usados atlas cerebrales de rata se basan en coordenadas “estereotaxicas”, para su elaboración³¹, pero están basadas en la localización de estructuras óseas para su ubicación exacta y en el desarrollo embrionario no ha terminado el desarrollo óseo del cráneo.
- Las áreas que queremos plasmar en nuestros gráficos pueden o no pueden estar bien definidas dentro de la comunidad científica, sin que exista un acuerdo completo en su ubicación exacta o incluso en el nombre que se le asigna para nombrarlas²⁹ o usando otras herramientas además de las anatómicas, como son las funcionales³².

Además en el caso que nos ocupa - el SNC en proceso de desarrollo embrionario - es una estructura cambiante en el tiempo tanto en tamaño como en volumen. El volumen de los ventrículos y del neuroepitelio que lo rodea se

expande rápidamente entre ED-12 y ED-18 pero luego decrece hasta ED-21, mientras que el parénquima continua aumentando³³. Por áreas, el crecimiento del telencéfalo es mucho mayor que la del diencefalo; en el telencéfalo el volumen de los ventrículos laterales y del neuroepitelio aumenta entre ED-15 y ED-18 para decrecer hasta ED-21, mientras que en el diencefalo el volumen del tercer ventrículo y su neuroepitelio decrecen de forma constante desde ED-15 hasta ED-21, aunque es importante poner de manifiesto que los cambios de volumen y de neuroepitelio están siempre ligados, sugiriendo una estrecha relación entre el tamaño del ventrículo y del neuroepitelio³³. Otra de las dificultades añadidas en el proceso embrionario es la orientación de los ejes, especialmente el eje longitudinal que debe rotar para generar las flexiones cefálica, pontina y cervical³⁴.

El primer intento de plasmar en imágenes el SNC, del cual tengamos clara referencia son los dibujos de Andreas Versalius en 1543²⁹, seguidos de otros realizados por Varolius en 1573 y por Vieussens en 1685, donde ya se detectaban los núcleos mas importantes así como tractos de fibras²⁹.

A lo largo de los siguientes siglos la resolución de los mapas planos cerebrales fue paralelo al desarrollo técnico: la introducción del microscopio de luz, las tinciones específicas del SNC, el uso de marcadores biológicos, la microscopia electrónica³⁵, permitiendo un mayor grado de conocimiento y por lo tanto de sofisticación.

Hasta finales de los años 80 todos estos resultados se plasmaban gráficamente en dibujos hechos a mano con lápiz y papel, sirva como ejemplo los magníficos trabajos de Cajal, a partir de ese momento se comenzaron a introducir las herramientas informáticas que nos permiten obtener dibujos pero estos son ejecutados por aplicaciones informáticas de programas gráficos de ordenador.

En 1972, Keyser en sus trabajos da un gran impulso a los mapas de dos dimensiones³⁴, y actualmente estos son continuados por numerosos autores

que trabajan en neuroanatomía de rata, especialmente durante el desarrollo embrionario³⁶.

El reto de plasmar una estructura de 3 dimensiones en 2 dimensiones ha sido el trabajo realizado, a lo largo de los siglos por los cartógrafos. La superficie terrestre presenta unas coordenadas cartesianas que corresponden a la longitud, latitud y altitud que se intentan plasmar en mapas geográficos. Su trabajo ha consistido en ofrecer mapas planos de superficies curvadas, buscando creativas soluciones para minimizar las distorsiones. Existen 3 propiedades básicas asociadas a una superficie curvada: el área, la distancia entre dos puntos y la forma. Y solo una de las tres se puede mantener sin distorsión.

Por todo lo anteriormente expuesto, hemos llegado a la conclusión de que los mapas planos de cerebro – en 2 dimensiones - podrían ser una solución razonable al problema que se nos plantea, a pesar de las limitaciones que tendremos que asumir²⁶. Tras estas consideraciones previas, hemos llegado a trabajar con mapas / gráficos cerebrales de rata en desarrollo embrionario desde ED-13 hasta ED-22 así como mapas para el desarrollo postnatal del atlas de coordenadas estereotáticas³¹. Además nos planteamos poder transferir la información a un formato visual y práctico. Esta tarea se ha visto facilitada por el uso de herramientas informáticas, cada vez mas complejas desde el punto de vista técnico y simultáneamente mas simples desde el punto de vista del usuario.

Los pasos seguidos para lograr las imágenes han sido:

- **Escaneado del material: Generación de una imagen.**

- Tratamiento de la imagen:

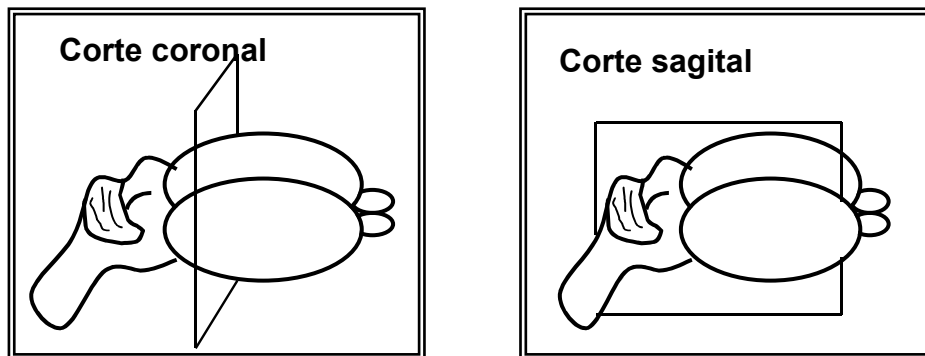
Formato de imagen:	Transparencia de 0%
	Lazo mágico: Recortar la imagen
	Borrar zona externa.
Efectos de imagen:	Plastificado
	Filtro: Fuerza de resaltado 50%
	Detalle: 75%
	Suavidad: 75%
Coloreado de la imagen	Realizar línea de contorno
	Ajuste de color: Se aplica dos veces
	Ajuste de verde

- Rotación de la figura para lograr la posición caudo-cefálica de un animal vertebrado cuadrúpedo.
- Creación del gráfico: nomenclatura de las áreas mas destacadas.
- Localización de las zonas de presencia del neurotransmisor, la enzima de síntesis y las fibras.

Las figuras de este trabajo han sido obtenidas fundamentalmente de dos fuentes. Las imágenes del periodo de desarrollo embrionario pertenecen al atlas de Altman & Bayer³⁶. Las imágenes postnatales corresponden a atlas de Paxinos et al³¹, que es de animal adulto. Proponemos un trabajo anatómico detallado en cerebro de rata en el periodo postnatal, dada la importancia de este periodo tanto a nivel anatómico como funcional.

Los gráficos presentados son de dos tipos: basados en cortes coronales y basados en cortes sagitales, para permitir visualizar la localización anatómica.

Figura 2.2.



Las figuras han sido obtenidas de:

- ED-11: Lámina coronal 11; pp. 33. Lámina sagital 1; pp. 5³⁶.
- ED-12: Lámina coronal 1; 63. Lámina Sagital 3; pp. 55³⁶.
- ED-13: Lámina coronal 1; pp. 113. Lámina sagital 1; pp. 99³⁶.
- ED-14: Lámina coronal 6; pp. 179. Lámina sagital 3; pp 157³⁶.
- ED-15: Lámina coronal 5; pp. 231. Lámina sagital 3; pp 211³⁶.
- ED-16: Lámina coronal 8; pp 295. Lámina sagital 3; pp 267³⁶.
- ED-17 Lámina coronal 10; pp 365. Lámina sagital 3; pp: 333³⁶.
- ED-18: Lámina coronal 9; pp 427. Lámina sagital 4; pp 399³⁶.
- ED-19: Lámina sagital 5; pp 461³⁶.
- ED-20: Lámina coronal 10; pp 489. Lámina sagital 5; pp 461³⁶.
- ED-21: Lámina sagital 3; pp 523³⁶.
- PND-1 en adelante: Sección sagital del cerebro de rata. Atlas esterotáxico de rata adulta, realizado por Paxinos y Watson³¹.

2.4. Herramientas informáticas.

Desde el punto de vista informático hemos utilizado varias herramientas que exponemos a continuación.

En lo relativo al hardware³⁷, se ha utilizado un ordenador Apple iMac G4 con una CPU 1,25 Mhz. El equipo dispone de 867Mb de memoria que han permitido un procesamiento rápido y eficiente de la información. Para mas información de la máquina proponemos ver una descripción mas exhaustiva que aparece en la pagina web de la marca³⁸. Uno de los puertos USB 2.0 del ordenador está conectado a un scanner Epson 3200 dpi. El otro puerto USB 2.0 está conectado a una impresora HP Inkjet 815C.

Respecto al software, el sistema operativo es Mac OSX 10.2. Mac OS X³⁹ es un sistema operativo moderno que proporciona la potencia de UNIX más la simplicidad y elegancia de Macintosh. Tiene una de las interfaces de usuario más elegantes y sencillas del mundo. El Finder es una característica del sistema operativo que proporciona una visión del sistema, como el acceso a archivos y carpetas preferidas con un clic, tanto si éstos están ubicados en el propio disco duro, o un servidor de red. Se ha utilizado el procesador de textos Microsoft Word Vx en castellano para escribir toda la literatura de la tesis. Este procesador de textos es el mas potente del mercado ya que proporciona la posibilidad de Auto-corrección. Este procesador de texto permite al usuario utilizar la función Auto-corrección para detectar y corregir errores tipográficos, ortográficos, gramaticales y de uso de mayúsculas y minúsculas. Microsoft Word incorpora una lista de correcciones integradas - denominadas elementos de Auto-corrección -, a la que se puede fácilmente agregar otros elementos o quitar los ya existentes. Así mismo este procesador de texto presenta otras herramientas como aquellas que hemos utilizado para las citas bibliográficas o las referencias cruzadas del texto, de gran utilidad en un trabajo de estas características. También Microsoft Word tiene una opción de selección múltiple que permite seleccionar elementos en párrafos, listas o celdas de tablas que no estén adyacentes.

Para la presentación así como para la generación de gráficos y esquemas incluidos en el texto, se ha utilizado Microsoft PowerPoint Vs. que tiene la

característica de generar transparencias, ofreciendo una gran potencia de manipulación y generación de imágenes, al permitir entre otras funciones, ajustar el porcentaje de transparencia de cualquier dibujo o imagen a nuestro alcance.

Con las herramientas informáticas disponibles y las plantillas, la herramienta informática utilizada para la generación de gráficos, es el Adobe Photoshop 6.0⁴⁰. Es una aplicación basada en la generación de vectores gráficos que son descripciones matemáticas de los dibujos. Esto es una importante ventaja dado el relativo pequeño tamaño de los archivos y se puede reproducir a diferentes escalas sin pérdida de calidad o detalle. El uso de esta herramienta informática también nos permite generar líneas de grosor uniforme, variar el color con fines didácticos y orientativos, variar la escala sin complicaciones técnicas, así como generar material impreso con relativa sencillez.

REFERENCIAS DE MATERIAL Y METODOS:

- ¹ Cordón García JA, López Lucas J, Vaquero Pulido JR. Manual de investigación bibliográfica y documental. Teoría y práctica. Madrid: Ediciones Pirámide. Grupo Anaya S.A.; 2001.
- ² Marcum JW. From information center to discovery system: next step for libraries. J academic librarianship 2001; 27(2) : 97-106.
- ³ Attwood TK, Miller CJ. Progress in bioinformatics and the importance of being earnest. Biohecnol. ann rev 2002; 8 : 1-54.
- ⁴ Wiggins B. Knowledge management – Reviews. International Journal of information management. 2000; 20 : 405-408.
- ⁵ Harkness T, Maxwell RL. The future of cataloging: insights from Lubetzky symposium. Proceedings of the symposium of American Library Association. 2000. J academic librarianship;2000: 236-237.
- ⁶ Tsai B. Information landscaping: information, mapping, charting, querying and reporting techniques for total quality knowledge management. Information processing and management. 2003; 39 : 639-644.
- ⁷ Kikuchi K et all. Local image filing in neurosurgery: validity of selective storage of radiologic images. J Exper Med. 1991 Sep; 1-11.
- ⁸ Martín-Sanchez F. et all. Synergy between medical informatics and bioinformatics: facilitating genomic medicine for future health care. J biomed inform. 2004; 37 : 30-42.
- ⁹ Bloom FE. Publishing (whatever that means) neuroscience in the new millenium. Brain res. 2000; 886 : 1-4.

- ¹⁰ Jankowska MA. Identifying University professors' need in challenging environment of information and communication technologies. *J academic librarianship*. 2004; 30: 51 – 66.
- ¹¹ Marenco L, Tosches N, Crasto C, Shepherd G, Miller PL, Nadkarni A. Achieving evolvable Web-database bioscience applications using EAV/CR framework: recent advances. *J.Am.Med. Inform Assoc*. 2003 Sep-Oct; 10(5):444-53.
- ¹² PubMed. Bases de datos en Biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid.
- ¹³ D'Inverno M, Howells P, Hu M, Luck M. Soft-link hypertext for information retrieval. *Information and software technology*. 2002; 44: 101-112.
- ¹⁴ Guerrero VP, de Moya F, Herrero V. Document organization using Kohonen's algorithm. *Information processing and management*. 2002; 38: 79-89.
- ¹⁵ Anderson JD, Perez-Carballo J. The nature of indexing: how humans and machines analyze messages and texts for retrieval. Part I: Research, and the nature of human indexing. *Information processing and management*. 2001; 37 : 231-254.
- ¹⁶ Adair JG, Vohra N. The explosion of knowledge, references and citations: psychology's unique response to a crisis. *American psychologist*. 2003; 58(1) : 15-23.
- ¹⁷ Jackson MS. Beyond relational databases. *Information and software technology*. 1990; 32(4) : 258-265.
- ¹⁸ Horvath AR, Pewsner D. Systematic reviews in laboratory medicine: principles, processes and practical considerations. *Clinica Chimica Acta*. 2004; 342 : 23-39.
- ¹⁹ EBSCO Host Research Database Medline. Guía de consulta UCM Biblioteca Complutense Julio 2004.
- ²⁰ Junghans TB, Sevin IF, Ionin B, Seifried H. Cancer information resources: digital and online sources. *Toxicology* 2004; 02:021.
- ²¹ Usui S, Yasumaguchi I, Ikeno H, Takebe K, Fujii Y, Okumura Y. Visiome environment: enterprise solution for neuroinformatics in vision science. *J neurocom*. 2004.01.172.
- ²² Martone ME, Gupta A, Ellisman MH. E-neuroscience: challenges and triumphs in integrating distributed data from molecules to brains. *Nat Neurosci*. 2004 May; 7(5):467-72.
- ²³ Wertheim SL. NeuroDatabase: multimedia exploration of nervous system. *Proc Annu Symp Comput Appl Med Care* 1991; 985-6.
- ²⁴ Van Pelt J, Van Ooyen A, Uylings HB. The need for integrating neuronal morphology databases and computational environments in exploring neuronal structure and function. *Anat Embryol* 2001 Oct; 204(4): 255-65.
- ²⁵ Amari S. et al. Neuroinformatics: the integration of shared databases and tools toward integrative neuroscience. *J. Integr Neurosci*. 2002 Dec; 1(2): 117-28.
- ²⁶ Dashti AE, Ghandeharizadeh S, Stone J, Swanson LW, Thompson RH. Database challenges and solutions in neuroscientific applications. *Neuroimage* 1997; 5 : 97-115.
- ²⁷ Mora F, Sanguinetti A.M. Diccionario de Neurociencia. Madrid: Alianza Editorial; 2004.
- ²⁸ www.pubmed.gov
- ²⁹ Swanson LW. Brain Maps: Structure of the Rat Brain. 2nd ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V.:1998.
- ³⁰ Garcia-Linares A. Informatica y atlas cerebrales. *Informática y salud* 2000 ; 27. Disponible en: http://www.conganat.org/seis/i_s/is27/i_s27f.htm
- ³¹ Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. San Diego, CA.: Academic Press; 1998.

-
- ³² San Molina J, Castillo ES. Desarrollo de un modelo geométrico-funcional de base neuroanatómica en el estudio de los procesos mnésicos. *Cerebro y Memoria*, 2004. Publicación de las Jornadas de Daño cerebral. Majadahonda, Madrid. Fundación Mapfre Medicina; 231-234.
- ³³ Bayer SA, Zhang X, Russo RJ, Altman J. Three-dimensional reconstructions of the developing forebrain in rat embryos. *Neuroimage* 1994; 1 (4) : 296-307.
- ³⁴ Alvarez-Bolado G, Swanson LW. Developmental brain maps: structure of the embryonic rat brain. New York: Elsevier Science B.V.; 1996.
- ³⁵ Robetson RT et al. Neuroanatomical research techniques. Methods in physiological psychology. Vol II. New York: Academic Press Inc.; 1978.
- ³⁶ Altman J, Bayer SA. Atlas of prenatal rat brain development. Florida: CRC Press, Inc.; 1995
- ³⁷ Maran R. Computadoras. Guía Visual. 2ª ed. Costa Rica: Trejos Hermanos Sucesores. S.A.; 1995.
- ³⁸ Ver pag web de MAC.
- ³⁹ Kelby S. Mac OS X. Trucos esenciales. Madrid: Ediciones ANAYA Multimedia; 2003.
- ⁴⁰ Aaland M. Adobe photoshop elements 2. Trad de la 1ª edición inglesa. Madrid: Ediciones Anaya Multimedia; 2003.

III. RESULTADOS.

DATOS SOBRE LA APARICIÓN DEL NEUROTRANSMISOR GABA EN COORDENADAS ESPACIOTEMPORALES: DISTRIBUCIÓN ANATÓMICA DEL GABA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO Y POSTNATAL DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA RATA.

La secuencia de aparición de diferentes neurotransmisores durante el desarrollo embrionario y postnatal de la rata, ha sido estudiado por diversos autores¹, siendo la serotonina el primero en detectarse, en ED-8, posteriormente en ED-10 se puede localizar fluorescencia producida por noradrenalina y dopamina², aunque las primeras células marcadas para dopamina en mesencéfalo de rata son de ED-11,5³. La aparición de marcaje producido por el GABA es posterior, sin embargo el sistema gabaérgico en su conjunto se diferencia relativamente pronto en comparación con otros sistemas⁴.

A lo largo de este capítulo vamos a seguir un orden estructural caudo-cefálico en las diferentes áreas: medula espinal, troncoencéfalo, cerebelo, diencefalo, cortex.

Como hemos puesto de manifiesto en el apéndice de la introducción – desarrollo embrionario de la rata- el cierre del tubo neural marca un hito fundamental en el desarrollo del sistema nervioso central, este no se cierra hasta ED-11, y es por ello que la mayoría de los estudios, salvo los expuestos anteriormente, nos presentan datos a partir de esa fecha.

Día Embrionario 11 : ED 11

Dependiendo de los diferentes métodos de trabajo que utilicen, hay autores que ubican la aparición en una fecha u otra. Para aquellos que trabajan directamente con el GABA, en ED-11 no se detecta ninguna presencia de cuerpos celulares marcados⁴, en cambio para los autores que trabajan en la enzima de síntesis es decir en la Ácido glutámico descarboxilasa, GAD, esta es la fecha inicial de

aparición de señales inequívocas de su presencia⁵. Esta fecha tan temprana de detección de células positivas para la GAD en rata también coincide con otras especies estudiadas como los ratones⁶.

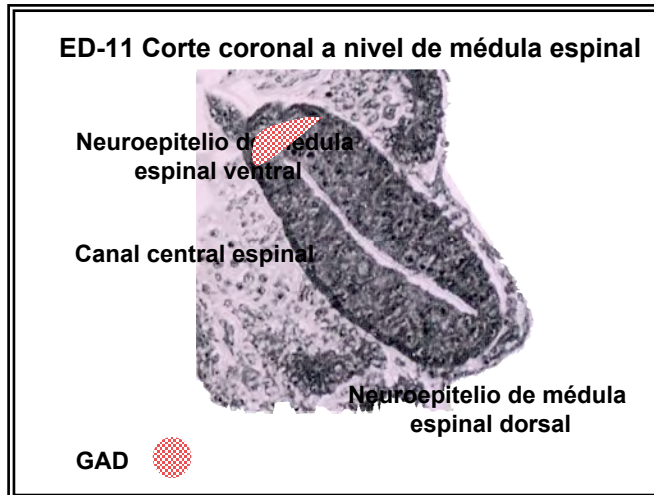


Figura 3.1.

Como hemos visto en la introducción, la enzima de síntesis del GABA, la GAD presenta dos isoformas la GAD67 y la GAD65. El estudio de ambas isoformas en médula espinal de rata nos da la primera señal de la presencia del sistema GABAérgico durante el desarrollo embrionario⁵.

En ED-11 se detecta m-RNA de GAD65 y GAD67 aunque la evolución posterior de cada una de ellas será diferente⁵.

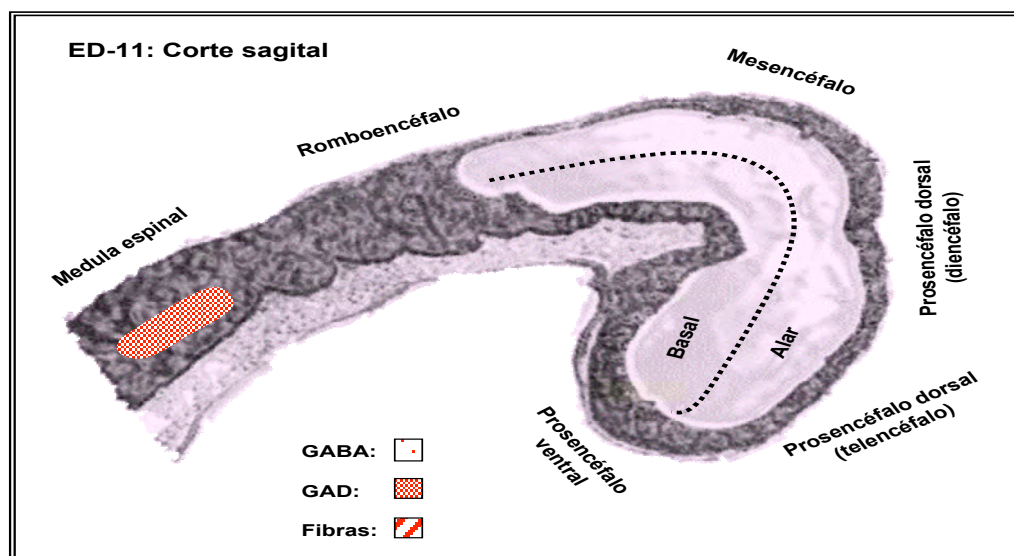


Figura 3.2.

Otros autores que trabajan en especies diversas, como son los ratones, estudian el momento de generación de neuronas inmunoreactivas para la GAD, en corteza somatosensorial, a través de inyecciones de marcaje radioactivo desde ED-0 hasta ED-17, han observado que las primeras células marcadas aparecen en ED-11, alcanzándose la velocidad máxima en ED-14, momento a partir del cual comienza a disminuir su producción hasta llegar a ED-17⁶.

Día Embrionario 12 : ED 12

Trabajos realizados en médula espinal, ponen de manifiesto que neuronas localizadas ventralmente, en la comisura de la médula en desarrollo, ya expresan el fenotipo gabaérgico⁷. Localizándose un número sustancial de células que expresan la isoforma GAD65 de la enzima de síntesis. Los axones de estas células los podríamos definir como comisurales y están concentrados en el borde lateral de la médula espinal, en posición dorsal a las neuronas motoras y en posición ventral con respecto a la zona de entrada de la raíz dorsal⁷.

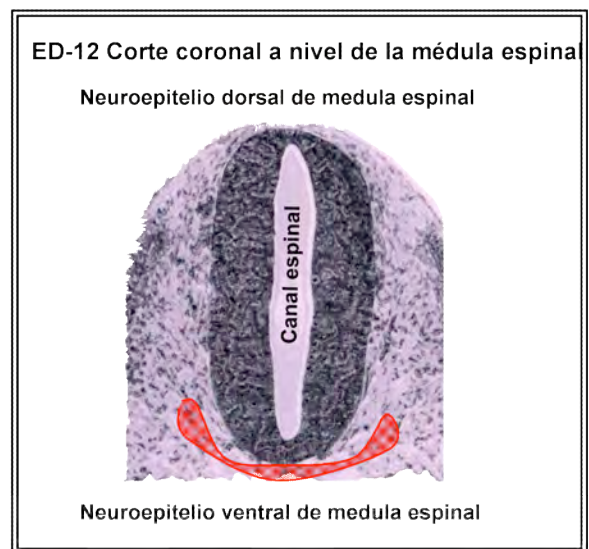


Figura 3.3.

Desplazándonos hacia posiciones mas rostrales, en ED-12 se observan unas pocas fibras GABA-IR cruzando el romboencefalo⁴.

Las neuronas prospectivas Gabaérgicas del hipocampo se comienzan a producir en ED-12 y este proceso se completara poco antes de alcanzar ED-20⁸.

En ED- 12,5 se han aislado células madre de la zona ventricular del telencéfalo de rata, que si se cultivan in vitro van a ir proliferando y diferenciándose en tres grandes tipos de neuronas:

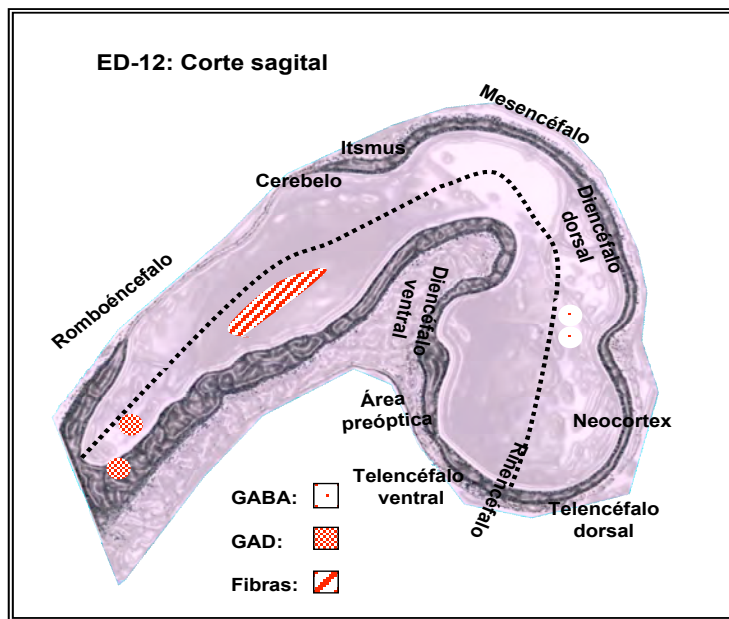


Figura 3.4.

- neuronas Glutaminérgicas
- neuronas que contienen ácido Aspártico
- neuronas Gabaérgicas⁹.

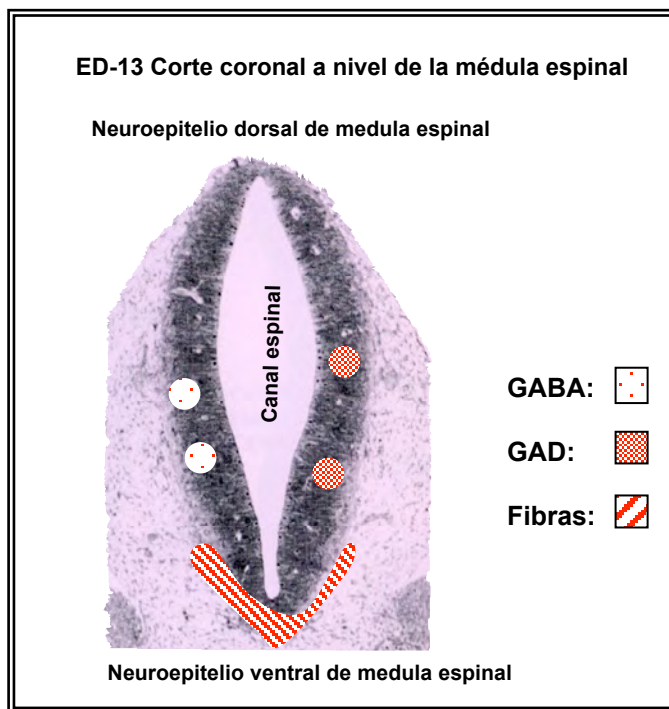
Día Embrionario 13 : ED-13

El trabajo de Lauder et al publicado en 1986 fue uno de los primeros que se realizaron de estas características sobre el GABA y va desgranando las diferentes fechas de aparición del neurotransmisor en las diferentes áreas. Fue un trabajo innovador en su época y muy amplio por su extensión. Este autor sitúa en ED-13 la aparición un sistema gabaérgico de fibras, en diversas áreas cerebrales ⁴:

- Se detecta un sistema de fibras en la zona marginal de la médula espinal y del romboencéfalo que se extienden hasta la flexión mesencefálica.
- En el mesencéfalo se detecta una región inmunoreactiva de fibras en la zona dorsal de la flexión mesencefálica.
- Se detecta una intensa tinción de los fascículos de la comisura posterior.

- Se detectan fibras en el diencefalo caudal, zona marginal del hipotálamo en desarrollo.
- Células GABA inmunoreactivas en el cuerpo estriado en desarrollo (eminencia ganglionar) y región setpal.

Durante ED-13 se comienza a detectar la isoforma GAD67⁷ de la enzima de síntesis en medula espinal, mientras que el m-RNA de GAD67 ya se había localizado en ED-11; este m-RNA se ha mantenido a un nivel constante hasta llegar a ED-13, a partir de este momento sus niveles aumentan paulatinamente, hasta ED-16, doblando la cantidad que es detectada cada 9.6 horas⁵.



También en medula espinal en ED-13 se detecta un masivo numero de axones de neuronas positivas para GAD65, que cruzan la comisura y van creciendo longitudinalmente en la zona marginal ventral⁷. El GABA que se detecta sigue un patrón mas parecido a la GAD67 que a GAD65⁷.

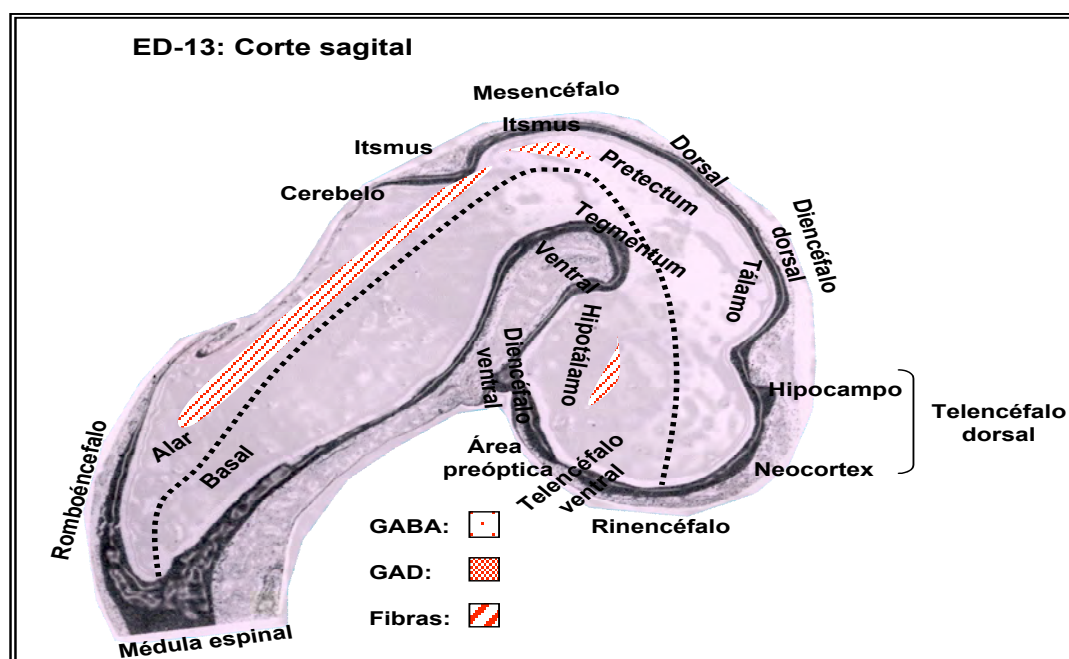
Figura 3.5.

En estudios posteriores que van siguiendo estas proyecciones de neuronas medulares comisurales, se observa que proyectan rostralmente en la zona marginal ventral contralateral, tuercen hacia la medula central y viajan hacia el mesencéfalo, donde parecen terminar en pequeñas ramas en el mesencéfalo lateral formando estructuras punteadas¹⁰.

En trabajos que estudian cuantitativamente la expresión del GABA en neuronas de médula espinal, se han encontrado que ya en ED-13 se puede medir tanto por análisis bioquímicos en homogenizados, como a través de análisis inmunocitoquímicos de células disociadas. Se ha detectado un porcentaje del 0,5% de células inmunoreactivas al GABA en médula espinal en este estadio¹¹. En cambio otros autores dan cifras muy diferentes, como Behar et al, que trabajando con células disociadas de medula espinal de rata y usando un antisuero que denominan como GAD-1 encuentran que el 75% de las células están marcadas¹², aunque simultáneamente con el suero denominado anti-GAD-2 no encuentran ningún tipo de marcaje¹².

Otro tipo de estudios realizados en células medulares disociadas de ED-13 ponen de manifiesto que durante este estadio del desarrollo, comienzan aparecer respuestas en canales de sodio, en receptores de GABA-A, así como en receptores de glutámico¹³, mostrando gradientes ventro-dorsales y rostro caudales¹³. La aplicación de GABA a motoneuronas espinales, genera corrientes eléctricas mediadas por Cloro, a nivel embrionario¹⁴.

Figura 3.6.



Autores como Ma et al¹⁵ trabajando también en medula espinal de rata pero a nivel cervical, detectan fibras GABA-inmunoreactivas, presumiblemente en la

sustancia blanca de la comisura ventral, el funículo ventral, la zona de entrada de la raíz dorsal y las raíces ventrales, aunque no se detectan cuerpos celulares^{16, 15}.

En regiones sub-corticales en ED-13, se comienzan a detectar células GABA-inmunoreactivas en la región de flexión pontina, en la sustancia negra en desarrollo, así como en la zona incierta y el hipotálamo¹⁷. Así mismo hay fibras GABAérgicas que pasan a través de la zona marginal desde el mielencéfalo hacia el diencefalo¹⁸.

Progresando hacia niveles mas rostrales, en trabajos realizados con inyecciones de timidina [³H] en ED-13, las células generadas en este momento se localizan en capas mas profundas de la corteza de adulto, mientras que las neuronas marcadas tras una inyección en ED-15 se localizan en capas mas superficiales¹⁹. En ED-13 comienza el periodo proliferativo de los neuroblastos que darán lugar a las neuronas de circuitos locales corticales, este periodo se mantendrá hasta ED-22¹⁷. Al estudiar en suspensiones de células extraídas del telencéfalo embrionario en ED-13, se detecta la presencia de un 3% de células GABAérgicas²⁰. Pero existen también otras áreas de generación de neuronas corticales en zonas ventriculares de regiones prosencefálicas subcorticales como son la prominencia ganglionar medial – MGE- y la prominencia ganglionar lateral –LGE-, ya que si se eliminan estas zonas disminuye el numero de células GABAinmunoreactivas en adulto¹⁹.

Día Embrionario 14 : ED 14

Como veíamos en el apéndice a la introducción, ED-14 es un día clave desde el punto de vista del desarrollo de distintos sistemas, incluida la vesícula telencefálica. El sistema gabaérgico va continuar desarrollándose en ED-14/15,

apareciendo en nuevas áreas y madurando en aquellas que ya estaba presente en el estadio anterior.

En el trabajo de Lauder, es en ED-14 cuando comienzan a detectarse cuerpos celulares de neuronas marcadas en muchas áreas además de las fibras que aparecían anteriormente, observandose⁴:

- Una densa red de fibras en troncoencéfalo que ocupan completamente la extensión dorsoventral del mielencéfalo. Esta densa red ocupa la zona intermedia , progresando hacia la flexión pontina.
- Algunas fibras pasan a través del metencéfalo hacia la flexión mesencefálica.
- Fibras GABA-IR que cruzan la superficie del tectum, y cuyo origen esta en la flexión mesencefálica.
- En el diencefalo caudal aparecen dos haces de fibras; el primero aparece dorsalmente hacia el fascículo retroflexo que separa el epitálamo/hipotálamo dorsal, yendo hacia la zona incierta, epitálamo, el retroflexus, la estría medularis y la zona de la epífisis pero sin llegar a entrar. El segundo esta situado rostralmente y recorre desde el hipotálamo hacia el quiasma óptico, el receso óptico, la eminencia ganglionar y el septum, en la región difusa.

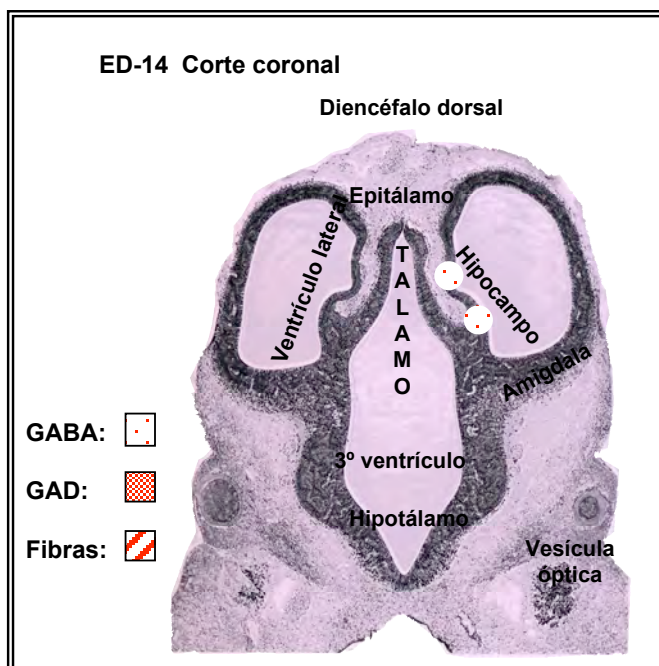
Comenzando por los niveles mas caudales, en médula espinal, estudios con m-RNA de la isoforma GAD65 de la enzima de síntesis, nos muestran que este transcrito ha aumentado exponencialmente desde ED-11, fecha en la que detectó por primera vez, doblándose la cantidad detectada cada 9 horas⁵. La otra isoforma GAD67 también se localiza y se observa que la distribución de ambas es similar⁷. Así mismo en neuronas comisurales de medula, donde se había detectado la presencia de GAD65 en días previos, si se compara el marcaje entre la zona cervical y lumbar se detecta que es mas intenso en la zona cervical que en la zona lumbar⁷.

En ED-14, las motoneuronas de la medula espinal, que son las primeras células espinales generadas, son además la primera población de células

immunoreactivas al GABA que nos encontramos¹⁵. Esta inmunoreactividad al GABA se detecta en los cuerpos celulares de dichas motoneuronas, a nivel cervical en embriones de CRL 8,5mm¹⁵.

Progresando desde las zonas más caudales hacia zonas más rostrales, observamos que en estudios realizados en cultivos celulares de neuronas extraídas del tronco del encéfalo del ED-14, estas células ya son inmunoreactivas al GABA²¹.

En otras regiones subcorticales, desde ED-14 hasta ED-21 la inmunoreactividad del GABA aumenta progresivamente tanto en cuerpos celulares marcados como en las fibras axónicas¹⁵.



En ED-14 encontramos en el hipocampo, en proceso de formación, que una gran mayoría de las neuronas GABAérgicas de este área se van a convertir en postmitóticas en este momento⁸. En el giro dentado, la fecha de nacimiento de las neuronas GAD-positivas es precisamente ED-14^{22, 23, 24, 25}.

Figura 3.7.

En el estriado se han realizado suspensiones de células extraídas en ED-14 y se detecta que un 6% de células son GABAérgicas²⁰.

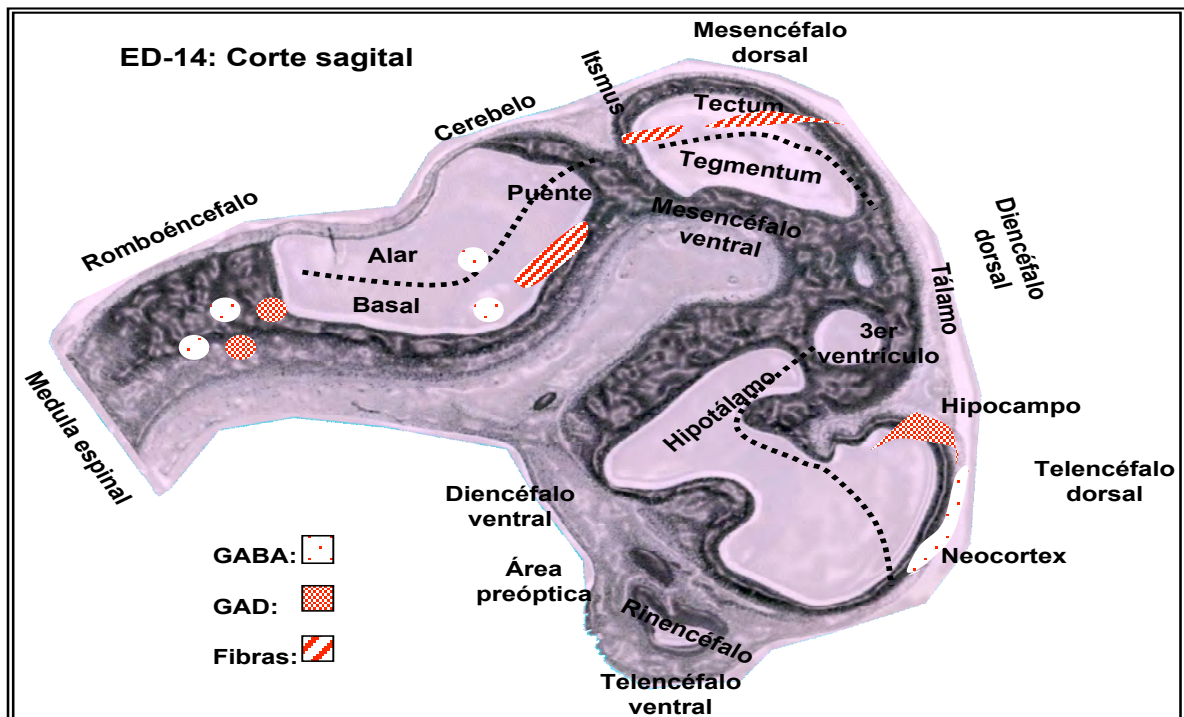


Figura 3.8.

En ED-14 se detectan en el neocórtex de rata las primeras células GABAérgicas y sus procesos, en el primodium plexiforme o capa plexiforme primordial^{26, 27}, también denominada la pre-placa¹⁹. En las vesículas telencefálicas en desarrollo es en esta fecha cuando se detectan por primera vez, cuerpos celulares GABA-IR (+) y procesos; pero solo podemos verlos en la parte más lateral del primodium cortical cerca del borde lateral²⁸. A lo largo de todo el desarrollo cortical, pero especialmente entre los días ED-14 y ED-18, se observa un gradiente latero-medial de diferenciación celular. Este gradiente tiene una naturaleza tal que la parte más lateral de la vesícula cortical en ED-14 es muy similar a la parte dorsomedial de ED-16 y lo mismo es aplicable al desarrollo del córtex entre ED-16 y ED-18²⁸.

Día embrionario 15 : ED-15

En ED-15 el cerebro de rata pesa unos 30 mgr aproximadamente o lo que es lo mismo 60 veces menos de lo que pesará en el animal adulto²⁹. Desde este momento y hasta el momento del nacimiento, la actividad de la enzima de síntesis GAD aumenta 6 veces su actividad²⁹. En ED-15 la concentración de GABA es de un 19% del nivel de GABA que encontraremos en la edad adulta²⁹.

En medula espinal de rata, en ED-15 y durante todo ED-16, la inmunoreactividad del GABA se intensifica, aumentando paulatinamente el número de neuronas inmunoreactivas, ampliándose su extensión desde zonas ventrales hacia zonas más dorsales¹⁵.

En las neuronas comisurales de la medula espinal, se detecta un cambio en el marcaje de la isoforma GAD65 de la enzima de síntesis, siendo ahora más intenso en la zona lumbar que en la zona cervical⁷. Durante ED-15 y así se mantendrá a lo largo de ED-16, se aprecia una disminución del marcaje de GAD65 en los cuerpos celulares y en los axones del ensanche cervical⁷, haciéndose más difícil su localización. Se han postulado varias explicaciones: una sería su localización diferente nivel subcelular, otra la regulación del sistema enzimático a través de la “down regulation” de la enzima, o tal vez la posible muerte celular⁷.

En estudios realizados con células disociadas de medula de rata, Behar et al utilizan un marcaje que denominan GAD-1, este marcaje aparecía en unos niveles del 75% de las células en ED-13, y en ED-15 ha descendido hasta situarse a un nivel del 45%³⁰. Según estos autores este nivel se mantendrá constante hasta llegar a PND-21¹².

Progresando hasta el hipotálamo, en estudios realizados con células extraídas en ED-15 ya se detectan en todas ellas corrientes evocadas por GABA, es decir todas las células de este área expresan receptores de GABA, aunque no así de

Glutámico o de glicina³¹. Aunque cabe plantearse la pregunta: ¿Qué células suministran el GABA al hipotálamo?

Trabajando también en hipocampo, se puede observar con estudios basados en marcaje radioactivo de ADN, neuronas GABA inmunoreactivas; estas células comienzan a generarse en ED-13 y lo harán hasta ED-18, siendo el momento máximo de producción en ED-15³². Este dato pone de manifiesto que posiblemente exista un desfase de 2 a 4 días entre la última mitosis de la célula y la expresión fenotípica del neurotransmisor; este retraso puede ser debido a la falta de sensibilidad de los métodos usados hasta ahora o al retraso de la expresión del GABA en las propias interneuronas del hipocampo³².

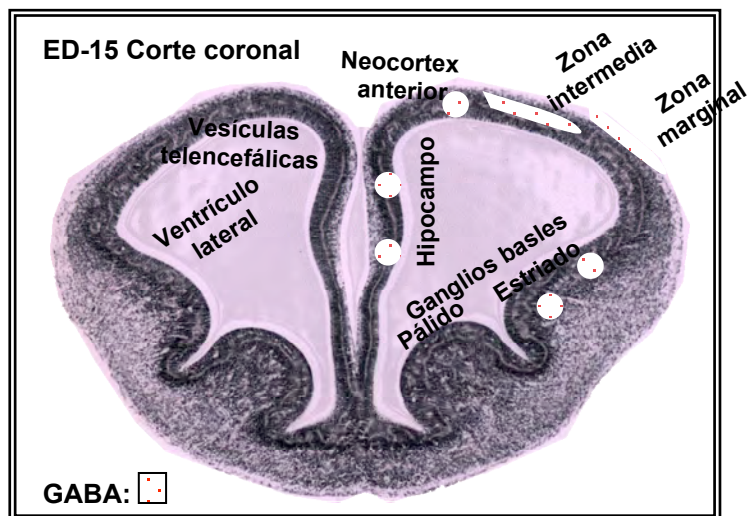


Figura 3.9.

Con células en suspensión extraídas de las vesículas telencefálicas en ED-15, se observa que hay un aumento de 5 veces en el número de células que contienen GABA, en comparación con el número de las que aparecían en ED-13²⁰. En otros trabajos donde se extraen células de corteza cerebral y se disocian para su estudio, se puede detectar células GABA inmunopositivas, que representan una sub-población de un 6% a un 8,5% del total de la población neuronal³². Además en ED-15 aparece una segunda población de neuronas Gabaérgicas corticales situadas en la zona intermedia³³.

El estudio de la neurogénesis de una subclase de células gabérgicas – calretinina positivas- del estriado de rata, se realizó con un estudio de doble marcaje,

observándose que el pico máximo de nacimiento de estas neuronas se encuentra en ED-15. Estas células estarán localizadas, después de su migración, en el neocórtico ocupando áreas laterales³⁴.

En ED-15 se detectan unas neuronas ovoides que son GABA-IR positivas en la zona marginal de las vesículas telencefálicas, identificadas posteriormente como neuronas Cajal-Retzius de la capa I de corteza cerebral de rata³⁵. En este estadio aproximadamente el 50% de estas neuronas ovoides localizadas en la zona marginal son GABA-inmunoreactivas³⁵.

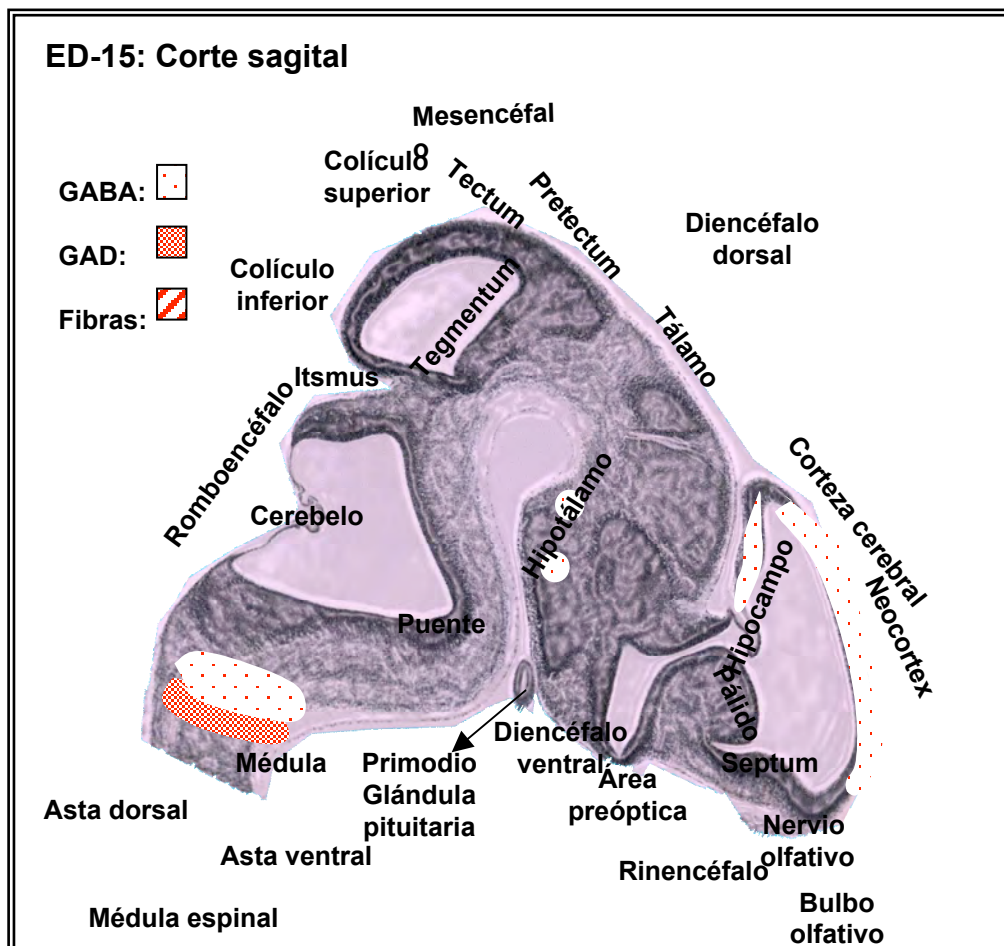


Figura 3.10.

Así mismo en corteza cerebral de rata en proceso de desarrollo, el índice de supervivencia de una neurona depende del momento en el cual se ha generado³⁶.

Según varios estudios se ha detectado que existen dos periodos de generación:

- Entre ED-15 y PND-11: Durante este periodo la expansión tangencial de la corteza aumenta a una velocidad media estable de 5,7% cada 2 días.
- Entre PND-12 y PND-60: Durante este periodo el tamaño del cortex - medido desde el borde lateral de la corteza cingulada hasta el borde dorsal de la corteza peririnal- aumenta un 9,8%.

Además la supervivencia de las neuronas esta relacionada también con su fenotipo, teniendo las neuronas de proyección o glutaminérgicas mas posibilidades de sobrevivir que aquellas de circuitos locales o gabaérgicas³⁶. La ontogenia de ambos grupos es similar, con la notable excepción de que los axones de proyección se desarrollan antes que los axones de circuitos locales; por lo que parece que encontrar una diana es un factor critico para determinar de la supervivencia de las neuronas corticales³⁶.

Día embrionario 16 : ED-16

Prosiguiendo con el trabajo de Lauder⁴ en ED-16, el patrón de marcaje de células GABA-inmunopositivas es bastante similar en general al que se había encontrado en ED-14 / ED-15, pero mas maduro en general, presentando un denso patrón de tinción en todo el cerebro⁴. En las diferentes áreas nos encontramos:

- Medula espinal y troncoencéfalo: Hay un aumento de las fibras marcadas en las zonas marginales cervicales.
- En la región de la flexión pontina, aparece tinción de cuerpos celulares en la zona ventricular. Por la apariencia de esta inmunoreactividad al microscopio de luz, es difícil de establecer si representa verdaderos cuerpos celulares o

consiste en terminales gabaérgicas peri-celulares que están rodeando otras terminaciones.

- En la flexión mesencefálica, en posición dorsal, aparece un haz de fibras que cursa hacia el diencefalo y el receso óptico. Este haz de fibras prosigue hacia el epitálamo y desde allí asciende hacia el área dorsal del tectum y del diencefalo donde se cruza lateralmente de 2 formas:
 1. Como fibras individuales.
 2. Como fibras dentro de fascículos situados en la comisura posterior y que terminan de forma abrupta en la epífisis, cuyo territorio no cruzan.

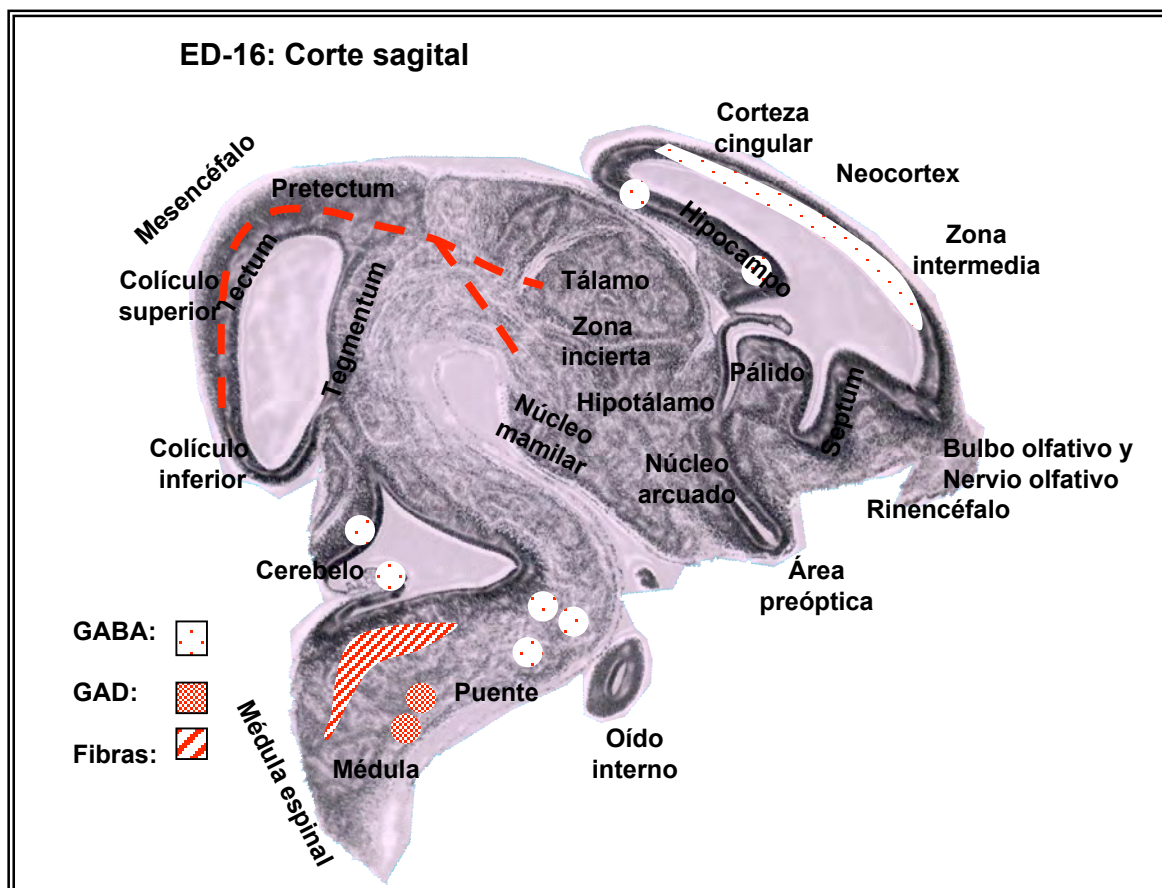


Figura 3.11.

- Aparecen fibras en el diencefalo, que se dividen en dos haces al llegar a los cuerpos mamilares:

1. haz de fibras que pasa rostralmente por debajo del tálamo hacia la zona incierta.

2º haz de fibras que va directo hacia la zona del receso óptico.

- Presencia de algunas células gabaérgicas en el área del estriado.
- En la corteza aparecen células GABA-IR(+) en la Capa I, un flexo de fibras, bajo el estrato cortical y la zona intermedia.

Si comenzamos por las zonas mas caudales podemos ver que en medula espinal, el m-RNA de la isoforma GAD67, ha ido aumentando paulatinamente hasta llegar a ED-16; en este momento va a cambiar su velocidad de producción, generándose del orden de 31.000 moléculas por día, hasta llegar a PND-0⁵. Por lo que podemos observar el patrón de la síntesis de la isoforma GAD67 es igual que el de la GAD65, pero con un retraso de dos días⁵.

En ED-16 en el área del cerebelo, se detecta por primera vez células GABA positivas marcadas con inumoreactividad para la enzima de síntesis GAD³⁷. La mayoría de estas células inumoreactivas presentan un único proceso corto, que en estos momentos es difícil de determinar como axón o dendrita, pero lo que aparece claro es que estas células se identifican como células de Golgi³⁷.

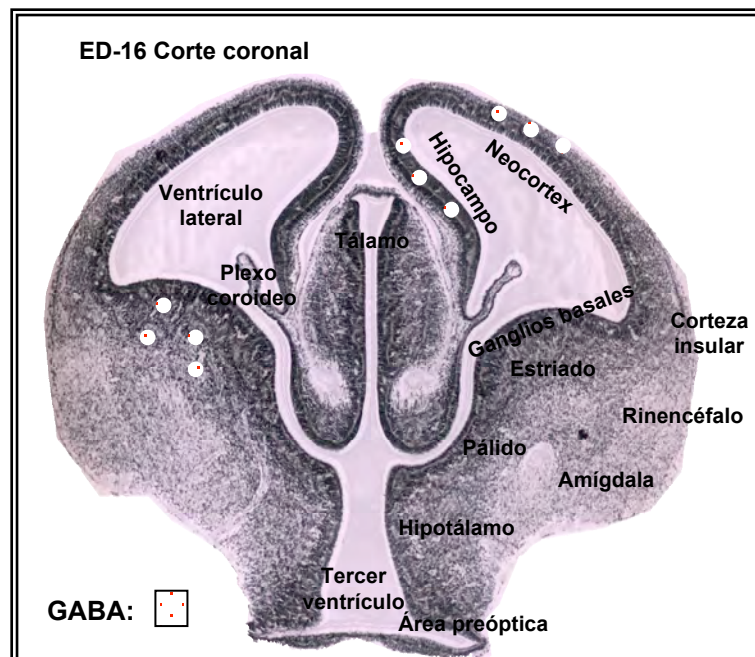


Figura 3.12.

Avanzando hacia el hipocampo, en trabajos realizados usando marcaje de BrdU, se observa que todavía hay interneuronas en proceso de división durante los días ED-16 y ED-17³⁸. Estas interneuronas GABAérgicas del hipocampo se dividen y arborizan antes que las células piramidales y las células granulares, de este área³⁸.

En ED-16, en el primodio del estriado, es el primer momento en el que se detecta GABA³⁹. En este estadio la gran mayoría de las células del estriado consisten en pequeñas células indiferenciadas que se organizan en pequeñas agrupaciones, entre ellas encontramos algunas células GABA-inmunoreactivas, este marcaje aparece tanto a nivel celular como sus prolongaciones, exhibiendo diversos grados de maduración³⁹. Además en este momento se detectan ciertas diferencias ligadas al sexo, en el número de células inmunoreactivas. Estas diferencias podrían ser debidas a varios motivos: Que en hembras haya un aumento de proliferación o una diferenciación mas rápida de los precursores gabaérgicos; o que en machos pueda existir una mayor perdida celular. Aún no se sabe si esta diferencia se mantendrá en el periodo postnatal³⁹.

En el neocortex de rata en desarrollo, algunos autores dividen la ontogenia del sistema GABAérgico en dos fases. La primera fase denominada no-sináptica tiene lugar entre ED-16 y ED-22, durante estos días el GABA se acumula en estructuras celulares somáticas. Posteriormente tendría lugar una segunda fase, denominada sináptica, que cubriría el periodo desde el nacimiento hasta la edad adulta, donde el número de botones sinápticos aumenta rápidamente y forma sinapsis. La sinaptogénesis parece que lleva un retraso de entre 1 y 10 días con respecto a la llegada de las células GABAérgicas a una determinada zona³⁵.

En el desarrollo cortical de la rata, desde ED-16 y a lo largo de toda la gestación, va a ir apareciendo paulatinamente neuronas GABAérgicas, que se observan en la zona marginal, en el sub-estrato y en el estrato cortical, así como en las zonas ventriculares y subventriculares²⁶, aunque según los diversos autores, trabajos o

técnicas utilizadas los datos pueden variar ligeramente. En el cortex de ED-16 encontramos que la capa I prospectiva, contiene gran número de células GABA-IR(+), densamente empaquetadas²⁸. Según estos autores aun no se detectan células GABA positivas en otras zonas, como el estrato cortical o la zona intermedia²⁸. Sin embargo en la zona ventricular de ED-16, es cuando se detectan las primeras células inmuno-positivas, localizadas en la zona dorsal de la vesícula²⁸.

En zonas concretas de la corteza como pueda ser la corteza visual y trabajando con doble marcaje: con auto-radiografía para detectar la fecha de nacimiento, e inmunocitoquímica del GABA, se observa que las células de la corteza visual de rata nacidas en ED-16 ya se encuentran en la capa VIa de la corteza⁴⁰, y que estas neuronas van a estar migrando hasta alcanzar su posición hasta PND-1⁴⁰.

En la corteza occipital también se encuentran células que acumulan GABA desde ED-16 en adelante⁴¹, este proceso se produce entre uno y dos días después de que las células hayan llegado desde el primordio del palidal, pero un día antes de que se empiecen a detectar las primeras sinapsis⁴¹.

Día embrionario 17 : ED-17

En ED-17 el aspecto general del cerebro en desarrollo representa bastante bien la silueta que tendrá en el adulto, excepto por el cerebelo que es más pequeño, tal y como indicábamos en la introducción⁴².

A nivel de la medula espinal, entre ED-17 y ED-19 el número de neuronas GABA-inmunoreactivas aumenta un 20%⁴³. En ED-17 se detectan por primera vez neuronas GABA-inmunoreactivas entre las neuronas de relevo de la Lámina I del asta dorsal de la medula espinal¹⁵. En este estadio del desarrollo se aprecia un gradiente de células GABA-IR (+) que tiene una dirección ventro-dorsal y rostro-

caudal en la médula en desarrollo, que va a persistir justo hasta el momento del nacimiento¹¹.

Los datos disponibles de ED-17 en otras áreas supramedulares son escasos, ya que tanto el tronco del encéfalo como el cerebelo presentan un patrón de marcaje muy similar al estadio previo; hay autores que los incluyen en ED-16, aunque otros los incluyen en ED-18⁴. Además en estos estadios del desarrollo las estructuras diencefálicas y telencefálicas pasan por grandes transformaciones que han captado un mayor interés entre los diferentes grupos de trabajo.

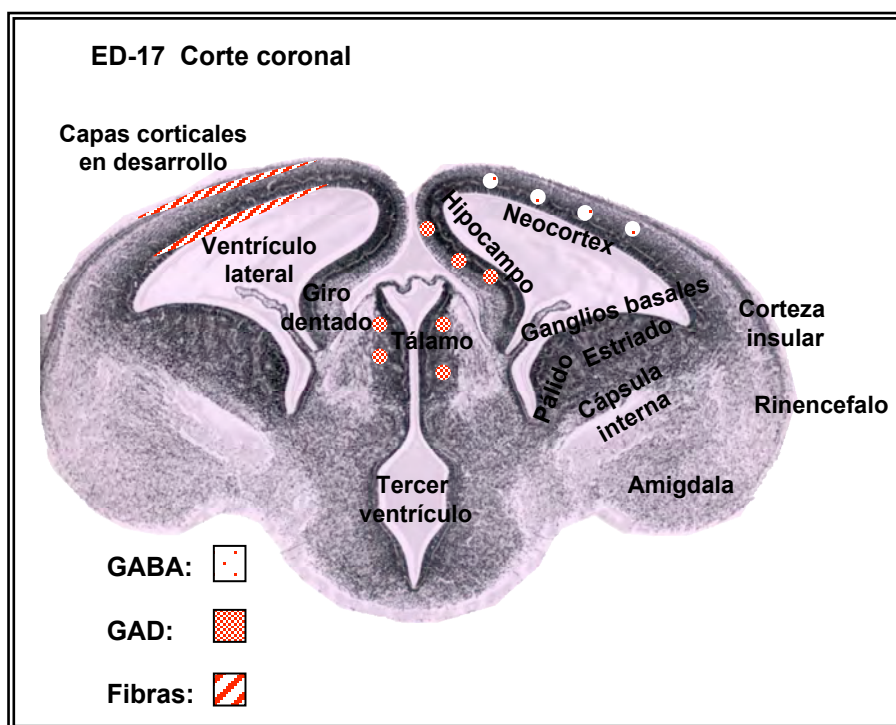


Figura 3.13.

Progresando hacia estructuras mas rostrales, encontramos que las células del núcleo reticular del tálamo, en estudios de hibridación in situ, muestran en ED-17, la presencia de mRNA para la GAD⁴⁴.

En ED-17/ED-18 se detectan por primera vez las dos isoformas de GAD, la GAD-67 y la GAD-65 en el hipocampo de rata en desarrollo⁴⁵. El desarrollo del marcaje de ambas isoformas de la enzima de síntesis en el hipocampo de la rata es muy similar, siendo mas notables los puntos comunes que las diferencias⁴⁵. La

isoforma GAD67 es mas prominente en la zona marginal del hipocampo, en el prospectivo estratum radiatum y en estrato lacunosum de CA1, formando una banda localizada inmediatamente adyacente a la capa de células piramidales en desarrollo⁴⁵. Además aparecen células marcadas GAD67 en la región del subestrato, parte del futuro stratum oriens y en la zona inferior intermedia, la futura sustancia blanca, pero son menos prominentes que las de la zona marginal⁴⁵.

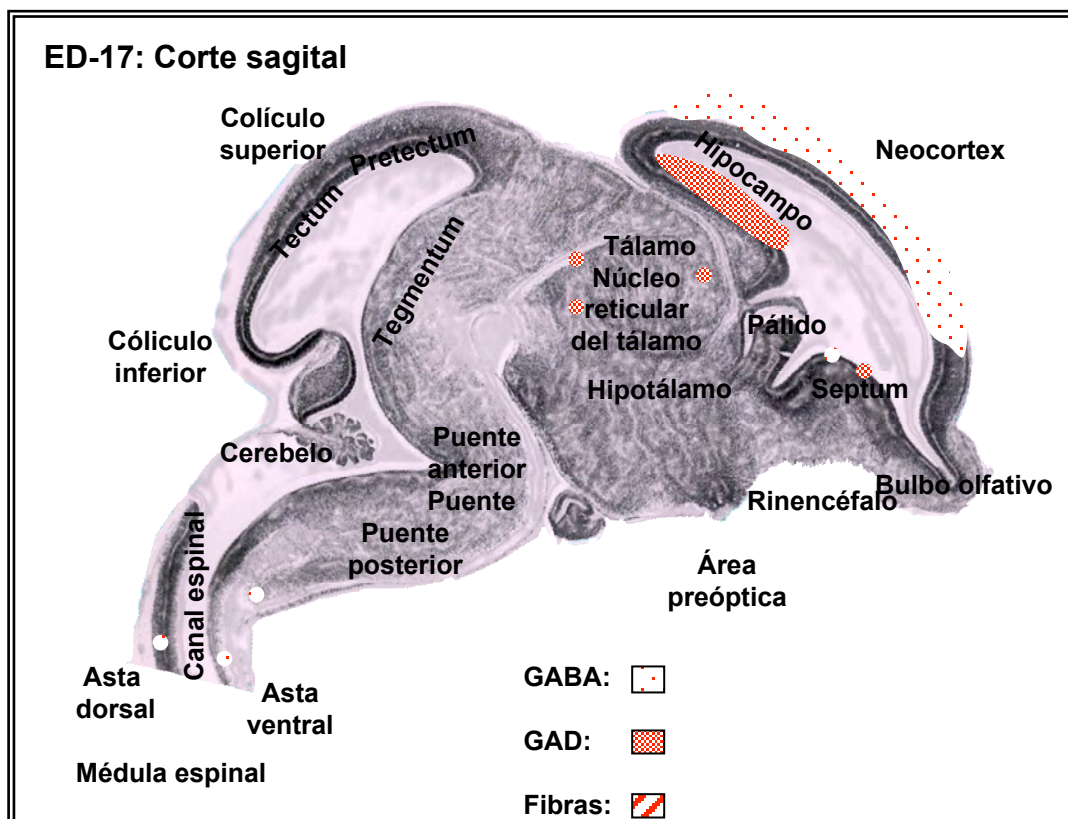


Figura 3.14.

Las células granulares, una población fundamental del giro dentado, se generan mayoritariamente postnatalmente, pero hay unas pocas que se generan prenatalmente y lo hacen en ED-17²⁵. Algunas de estas células granulares surgen directamente de las células progenitoras del neuroepitelio que tapiza el ventrículo lateral, mientras que otras muchas son generadas de una población proliferativa

localizada en el futuro hilus del giro dentado²⁵. Desde esta región proliferativa las células granulares migran pequeñas distancias y se asientan en su capa, siguiendo un patrón fuera-dentro; como resultado de este gradiente neurogénico, las células tempranas residen en la porción externa de la capa granular y las células tardías ocupan la porción interna de la capa²⁵.

Con células extraídas del área septal y del hipocampo, se han realizado estudios in-vitro para detectar la presencia de células GABA, a través de la inmunoreactividad de la enzima de síntesis GAD. Los resultados de estos trabajos indican que las neuronas GABAérgicas son las células predominantes en estas áreas, representando un 72% de la población en el cultivo septal, un 70% en el cultivo de hipocampo y un 67% en el co-cultivo del septo e hipocampo⁴⁶. Aunque, el tamaño de estas poblaciones GABAérgicas esta todavía sometido cierta controversia, ya que algunos autores con estudios realizados con otros métodos como los propios anticuerpos anti-GABA, nos dan cifras del 6% de las células solamente⁴⁶. A pesar de estas discrepancias, en general todos los autores ponen de manifiesto que las interneuronas GABAérgicas son la población mayor de interneuronas de numerosas regiones cerebrales⁴⁶.

A nivel del cortex cerebral, las neuronas destinadas al estrato cortical, durante ED-17 migran lejos de las zonas ventricular y subventricular²⁸. Se comienza a laminar esta estructura y en este momento encontramos células GABAérgicas y fibras paralelas a las zonas ventricular y marginal, así como elementos aislados entre el sub-estrato y el borde del estrato cortical emergente²⁷.

Día embrionario 18 : ED-18

Lauder et al en su trabajo nos presentan unos datos para ED-18 y ED-20, donde persiste el patrón descrito anteriormente⁴, pero se observan mas claramente los cuerpos celulares de las neuronas GABAérgicas. Encontramos que aparecen

cuerpos celulares GABA-IR(+) en zonas como el septum, tálamo, tectum, troncoencéfalo, cerebelo y en la formación hipocámpica.

Este autor también detecta en cerebelo células GABA-IR (+) en la región ventral del estrato cerebelar cerca del ventrículo⁴.

A nivel del hipocampo también se detectan células GABA-IR(+) por primera vez en áreas como el Hilus, la capa molecular del giro dentado, el estrato radiatum y el Cuerno de Ammon⁴.

Así mismo las células nacidas en ED-16 en el estriado ahora se encuentran dispersas por el caudado-putamen, completamente establecidas⁴.

En la corteza persiste todo lo desarrollado anteriormente y aparece una zona de tinción mas intensa en capa I que aparece como dos bandas. También las células del estrato cortical se distribuyen dando un aspecto en general mas maduro⁴.

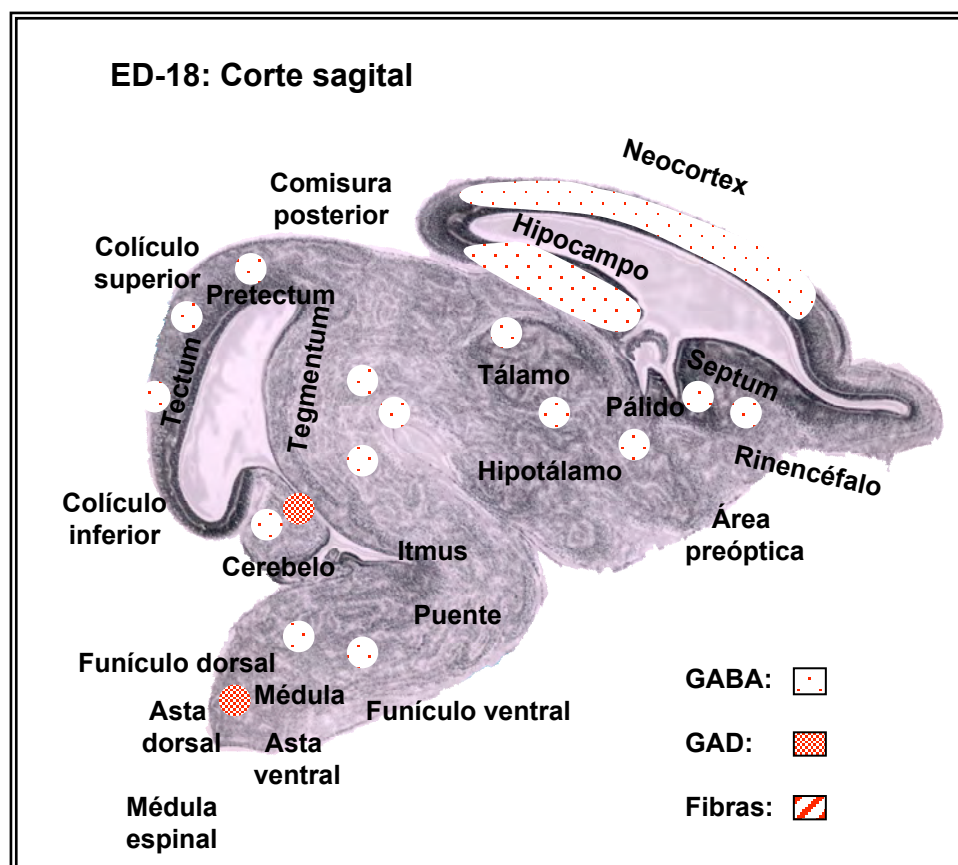


Figura 3.15.

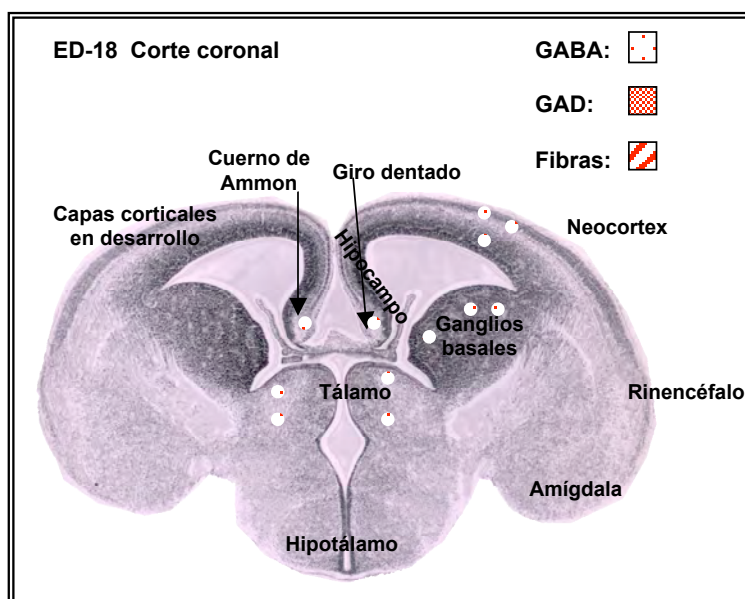
Otros autores trabajando en la medula espinal de rata, observan que el m-RNA de la GAD65 detectado en ED-11, y que había ido aumentando paulatinamente hasta llegar a ED-14, y entre ED-14 y ED-18 se mantiene constante, en meseta, comenzando a declinar a partir de ED-18⁵.

Las interneuronas de la sustancia gelatinosa de la medula espinal son las últimas células generadas en la medula y también son las últimas en expresar inmunoreactividad al GABA, apareciendo esta en ED-18¹⁵. En la medula espinal entre ED-18 y ED-19 se alcanzan los niveles máximos, tanto en el número como en la intensidad de la inmunoreactividad¹⁵, ya que parece que las células, expresan el fenotipo gabaérgico entre 1 y 3 días después de que la célula haya abandonado su ciclo celular¹⁵.

En cerebelo, en ED-18 aparece marcaje GABA-positivo a través de la inmunocitoquímica de GAD, en células de Purkinje, en la parte posterior³⁷.

Cuando se preparan colículos completos extraídos de ED-18 se detecta presencia de GABA en estas preparaciones⁴⁷.

Si progresamos hacia zonas más rostrales, observamos en ED-18 una intensa



tinción en hipocampo, principalmente en dos capas: la primera capa estaría situada en la zona intermedia, cerca de la zona ventricular en el plano horizontal paralela al ventrículo.

Figura 3.16.

La segunda capa estaría situada en la zona marginal³². Además se detectan algunos cuerpos celulares GABA-IR en la capa piramidal en CA1³².

En corteza de rata, las células GABA-IR(+) del sub-estrato forman un continuo en estos momentos del desarrollo; las mas superficiales, localizadas en el estrato cortical, aun están poco diferenciadas y se caracterizan por su forma bipolar y su orientación vertical, mientras que las situadas en estrato cortical pero en la parte inferior, ya han comenzado a adquirir un aspecto mas maduro, adoptando formas multipolares²⁸. En corteza occipital las células que contienen GABA, se encuentran fundamentalmente en la capa I y debajo del estrato cortical⁴¹.

Día embrionario 19 : ED-19

La mayoría de los autores en sus trabajos asimilan los resultados del día ED-19 a lo que ocurre en ED-18 o al ED-20, es decir al día inmediatamente anterior o posterior, momentos en los cuales parece que los cambios son mas críticos. Por lo tanto no disponemos de datos a nivel medular.

En el cerebelo, durante ED-19 el numero de células de Golgi marcadas anteriormente, han ido aumentando en numero e intensidad, si comparamos con los resultados de ED-16³⁷. También las células de Purkinje están mas intensamente marcadas que el día anterior, pero menos si las comparamos con las células de Golgi³⁷.

En ED-19 ya encontramos células GABA-inmunopositivas en el núcleo reticular del tálamo⁴⁴, recordamos que en ED-17 habíamos detectado mRNA para GAD en trabajos de hibridación in-situ en este mismo núcleo.

Progresando hacia el hipocampo en formación, en ED-19, en se detecta mRNAs para GAD-67 en el giro dentado y en la zona marginal, en lo que será la futura capa molecular dentada^{24, 45}. Las células marcadas para GAD67 ocupan posiciones en CA1 y CA3, en las zonas marginales del hipocampo, y en los sub-

estratos de estas áreas⁴⁵. Así mismo también en el giro dentado, aparece marcaje, en células que presentan la isoforma GAD65⁴⁵.

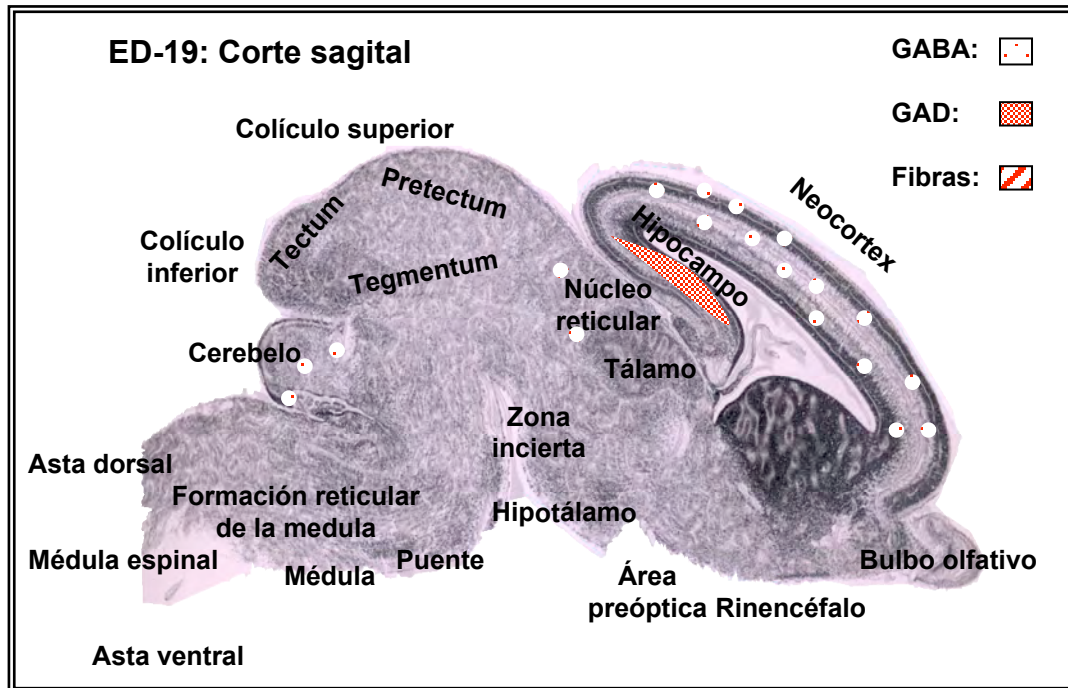


Figura 3.17.

En el desarrollo del neocórtex de rata, en ED-19 se observa que las células GABAérgicas aumentan en número en el estrato cortical mientras que disminuyen en la zona intermedia y la zona subventricular²⁶. En ED-19 nacen unas neuronas que son GABA-inmunoreactivas que están destinadas a formar parte de las capas II - III, estas células van a estar situadas en los dos tercios mas profundos de dichas capas⁴⁰.

Día embrionario 20 : ED-20

En ED-20 llegamos al tramo final del periodo gestacional de la rata y observamos que los procesos que tienen lugar son un continuo entre lo que ha sucedido los días anteriores así como los posteriores.

A nivel bioquímico en estudios realizados con material extraído de ED-20, se observa que el GABA estimula la captación de Cloro, y que este proceso es potenciado por la presencia de diazepam, en sinaptoneurosomas de cerebro de rata⁴⁸.

Si observamos lo que ocurre en la medula espinal de ED-20, observamos que las células GABA-IR(+) disminuyen en numero, y esta disminución se realiza siguiendo un gradiente ventro-dorsal; este gradiente comienza a formarse en este periodo final de la gestación¹⁵.

Desgraciadamente no disponemos de datos en zonas supramedulares en ED-20, aunque como veíamos en el apéndice de la introducción a nivel del cerebelo, tienen lugar eventos importantes ya que comienza a observarse por primera vez la fisura separando el futuro lóbulo inferior en la vermis, así como el flóculo en los hemisferios.

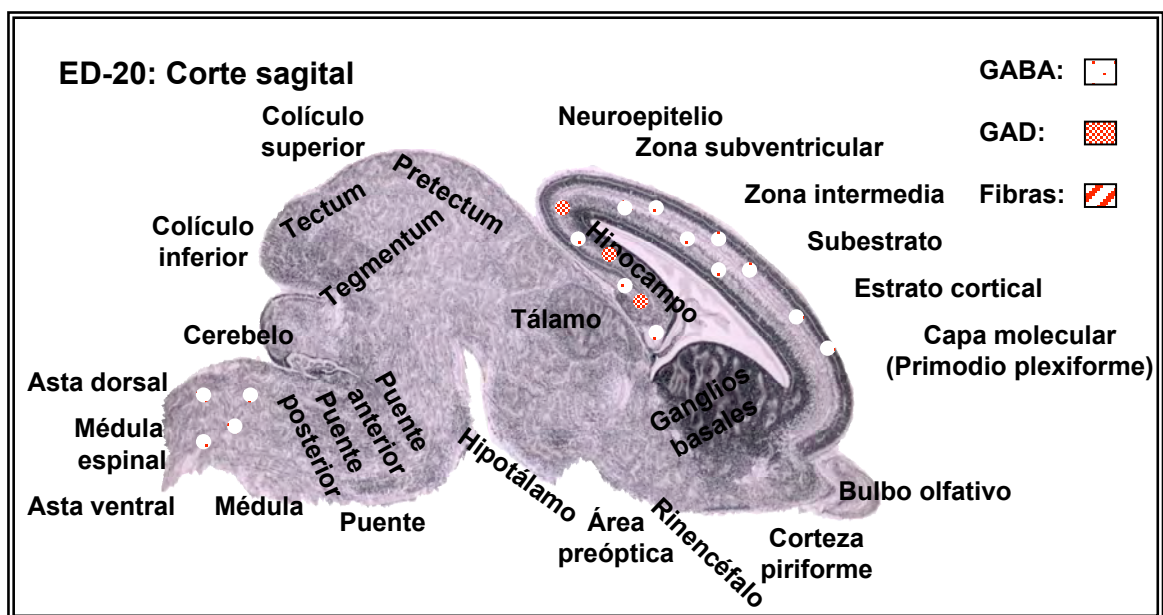


Figura 3.18.

Progresando rostralmente hacia el hipocampo, en la fascia dentada de ED-20, observamos que aparecen en la capa molecular las primeras células marcadas GABA-IR (+). Este marcaje va a decrecer hasta llegar al día PND-3, en esta capa mientras que va a aumentar en el hilus, siguiendo el desarrollo típico de la fascia dentada³². Las células de hipocampo marcadas para las isoformas de la enzima de síntesis GAD67 y GAD65 también se detectan en ED-20, siendo más evidentes los cuerpos celulares marcados para GAD65 que aquellos positivos para GAD67⁴⁵. Las células GAD67 se localizan en la zona marginal, tanto del hipocampo como del giro dentado⁴⁵, estando estas células muy concentradas justo por encima del borde exterior de la capa granular²⁴. Así mismo se observan células marcadas en CA1 y CA3 de hipocampo y probablemente son células que habrían nacido en ED-14²⁴. Las células marcadas con GAD67, se localizan en ED-20 dentro de la capa molecular en desarrollo y van a migrar hasta llegar a localizarse a lo largo de la base de la capa granular del giro dentado²⁵. Siendo los cuerpos de células GAD65 más evidentes que los cuerpos celulares que contienen GAD67⁴⁵.

En ED-20 el grosor de la pared cortical de la vesícula telencefálica ha ido aumentando notablemente²⁸. La lámina cortical ha comenzado su diferenciación en un estrato cortical, un hecho que se refleja en la apariencia más madura de las células GABA-IR(+)²⁸. En la parte superior de la corteza cerebral en desarrollo, la parte indiferenciada del estrato cortical contiene neuroblastos post-migratorios típicos – estas células son interesantes porque expresan GABA antes de completar su diferenciación morfológica y aunque algunas son claramente positivas, hay otras que muestran una inmunoreactividad muy débil²⁸. Las células GABA-IR(+) del sub-estrato son abundantes en este estadio, y son neuronas que en su mayoría presentan procesos orientados horizontalmente²⁸. En ED-20 la inmunoreactividad al GABA está concentrada en los cuerpos celulares y en las terminaciones sobre las células diana sobre las que actúa¹².

Día embrionario 21: ED- 21. Final del desarrollo embrionario

El día embrionario 21, ED-21, marca el final del desarrollo fetal y por lo tanto muchos sistemas van a terminar de organizarse, mientras que otros van a continuar con un patrón progresivo, que durara a lo largo del periodo postnatal.

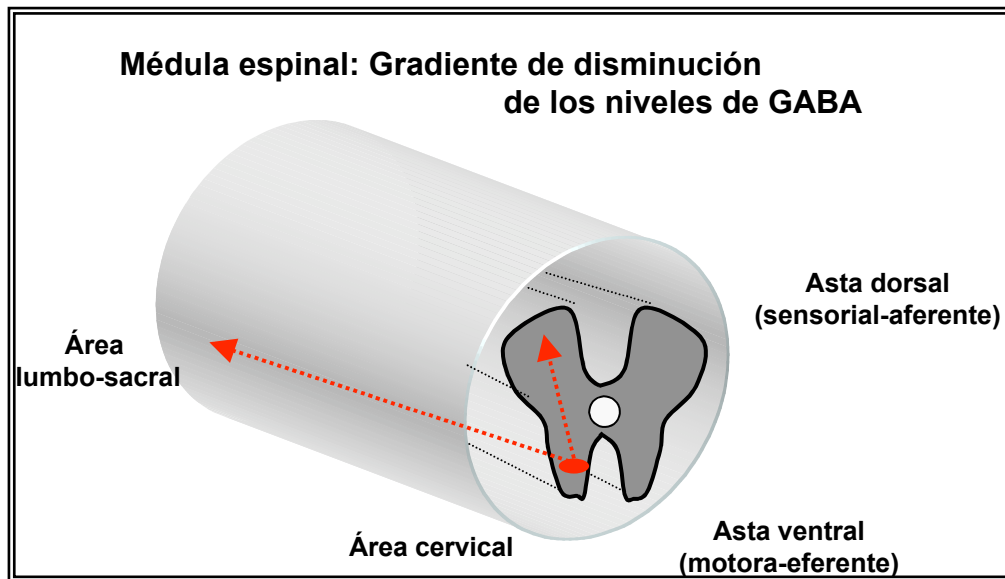


Figura 3.19.

La inmunoreactividad del GABA de las células de medula espinal desciende en intensidad y en extensión hacia el final de la gestación; este retroceso comienza en el asta ventral de la región cervical y termina en el asta dorsal de la región lumbosacral¹⁵. Observándose una inversión del gradiente entre las regiones cervicales y lumbosacrales, indicándonos que probablemente la inmunoreactividad al GABA en zonas discretas anatómicas, es un fenómeno transitorio¹¹.

Las neuronas comisurales de la medula espinal de la rata, que expresaban las isoformas GAD65 y GAD67 de la enzima, desde los estadios tempranos del desarrollo, presentan al final del periodo embrionario unos niveles de marcaje con GABA muy superiores a cualquiera de las dos isoformas de la enzima de síntesis⁷.

Los estudios por Behar et al, con células dissociadas de medula espinal de rata, comenzaron a teñirse con un suero denominado anti-GAD-1 en ED-13, pero con un suero denominado anti-GAD-2, comienzan a teñirse en ED-21, cuantificando esta población de células se observa un porcentaje del 2%¹².

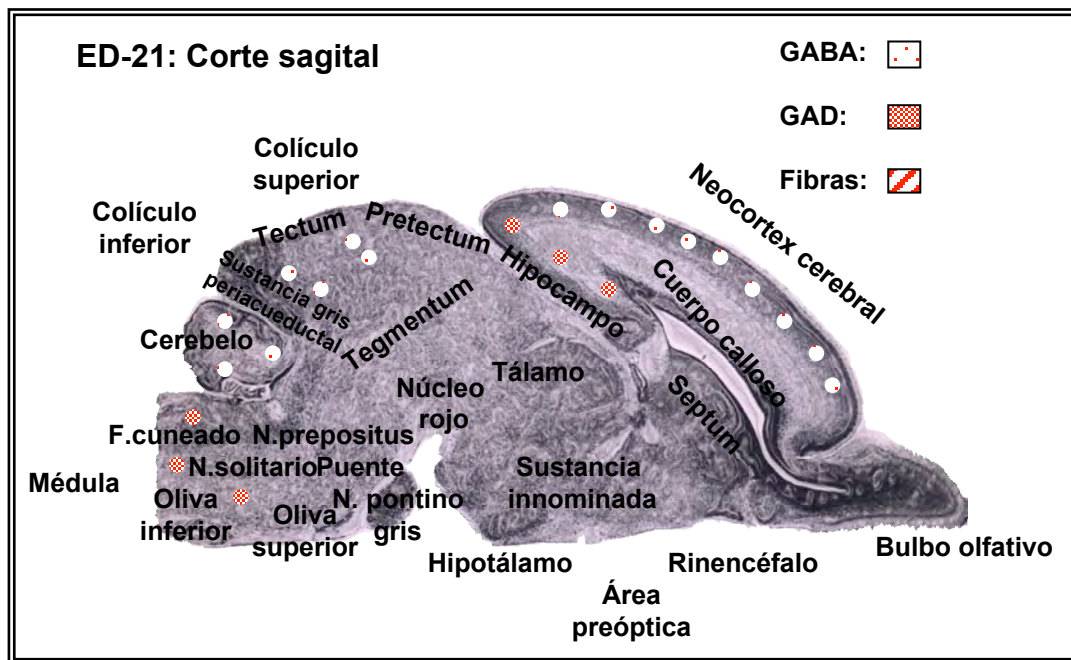


Figura 3.20.

A nivel de cerebelo, en ED-21, las células de Purkinje de la zona posterior comienzan a migrar y están mas intensamente marcadas que aquellas situadas en la zona anterior³⁷. Las células de Golgi positivas se encuentran todavía migrando hacia los lóbulos cerebelosos y alargando sus prolongaciones³⁷.

A nivel mesencefálico en el colículo superior, se ha estudiado la capa gris superficial -SGS, stratum griseum superficiale-, extrayendo células de ED-21, y por incorporación de marcaje de [³H]GABA, se ha observado que el número de células positivas constituye el 40% de toda la población disociada⁴⁹. También la sustancia gris periacueductal que ya se puede localizar usa el GABA como neurotransmisor inhibitorio⁵⁰.

En ED-21, en el hipocampo en desarrollo aparece un cambio de marcaje para la isoforma de la enzima GAD67, siendo menos evidente el número de células marcadas y estando localizadas inmediatamente adyacentes a las capas piramidales y granulares⁴⁵. Los procesos celulares GAD67-positivos se extienden a través de CA1 y CA3 de células piramidales⁴⁵.

Así mismo las neuronas GABA-IR(+) de corteza cerebral que se generaron en ED-15 y presentaban una forma ovoide, han ido desarrollando en ED-21, una o dos prolongaciones gruesas en la capa plexiforme³⁵, y comparadas con otras células presentan un aspecto más maduro con un núcleo bastante desarrollado, rodeado de un rico citoplasma³⁵.

Día embrionario 22: ED-22 - Día del nacimiento²⁵. Final del periodo embrionario e inicio del periodo postnatal

El día 22 de gestación marca el final de la gestación y el comienzo de la vida extrauterina, ya que según la mayoría de fuentes consultadas el tiempo medio de gestación se encuentra entre los 21 y 23 días.

Existen pocos datos sobre este momento, ya que la mayoría de los autores los datos del último día de gestación, los presentan como ED-21 y a partir del nacimiento los muestran como PND-0 o como PND-1, como veremos a continuación.

Periodo postnatal

Según hemos ido desarrollando el trabajo para la elaboración de esta tesis, se fue haciendo cada vez mas evidente que había que incluir una sección dedicada al periodo intermedio, situado cronológicamente entre el desarrollo embrionario del sistema GABAérgico de la rata y del sistema GABAérgico del Sistema Nervioso Central del animal adulto, ya que este periodo madurativo posee entidad propia. Este periodo postnatal que es previo al establecimiento definitivo del patrón de

distribución del GABA del adulto, presenta unas coordenadas temporo-espaciales propias, así como características funcionales que merecen que pongamos de manifiesto; a continuación analizaremos algunos aspectos de la organización postnatal en clave de:

- Coordenadas Temporales
- Coordenadas Espaciales
- Coordenadas Funcionales

Coordenadas temporales

Las coordenadas temporales en las cuales se enmarca el desarrollo postnatal de la rata presentan cierta variabilidad en función del autor consultado y nos encontramos con diferentes nomenclaturas según los diversos autores. El primer día de vida postnatal - Postnatal Day o PND en las siglas inglesas - de la rata aparece en la bibliografía como PND-0⁵¹ o como PND-1^{52, 53, 54, 55}, aunque con tendencia a usar de forma mas frecuente la denominación PND-1, siendo esta la que nosotros vamos a usar en este trabajo.

En lo que respecta a la duración de los diferentes periodos de desarrollo, las fronteras no están completamente definidas, variando de nuevo, de unos autores a otros, en función de los resultados de sus trabajos o de las propias coordenadas temporales que hayan utilizado, aunque no siempre exponen claramente los criterios que les llevaron a elegir una ventana temporal frente a otra. Nosotros vamos a utilizar en nuestra descripción los que ubican los resultados mas recientes en tres periodos temporales⁵⁵:

- Periodo neonatal: PND-1 a PND-7
- Periodo inmaduro: PND-8 a PND-14
- Periodo adolescente: PND-15 a PND-21

Aunque con diferentes nomenclaturas, otros autores proponen periodos similares⁵⁶:

- Jóvenes: PND-4 a PND-10
- Juveniles: PND-11 a PND-16
- Adultos : PND-28 a PND-41

Así mismo el destete de la rata, que puede ser un dato interesante desde el punto de vista de madurez funcional en la conducta alimenticia, se produce entre PND-21 y PND-28, según los diferentes autores⁵⁴. La madurez sexual de la rata marca el final del periodo adolescente y el inicio de la edad adulta, considerando que la pubertad cubre desde la semana 8 - PND-56 - hasta la semana 12 - PND-84 - y la edad para comenzar a reproducirse tiene lugar entre la semana 10 - PND-70 - y la semana 12 - PND-84 -⁵⁷.

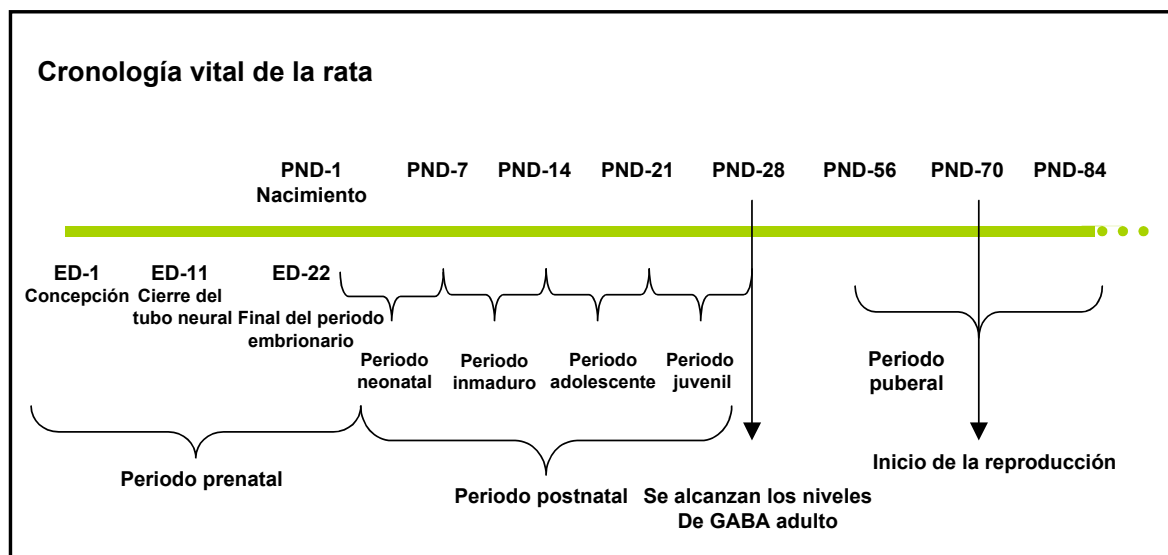


Figura 3.21.

Según los diferentes autores y nomenclaturas encontramos diferentes fechas para el final del desarrollo postnatal y la instauración de los patrones de cerebro de rata adulta. La mayoría de los autores consideran que es a partir del PND-22, cuando se alcanzan los niveles del adulto⁵², ya que los datos obtenidos en esta fecha están en concordancia con los datos obtenidos en animales de PND-60⁵³, que ya

son definitivamente adultos. Sin embargo otros autores retrasan este momento hasta PND-28⁵⁶, para alcanzar niveles similares al adulto. Otros autores, en cambio lo adelantan a PND-21, momento en el cual se instaurarían los patrones de desarrollo adulto⁵⁸. En todo caso observamos que este periodo varia entre PND-21 y PND-28, es decir entre la tercera y cuarta semana de vida postnatal.

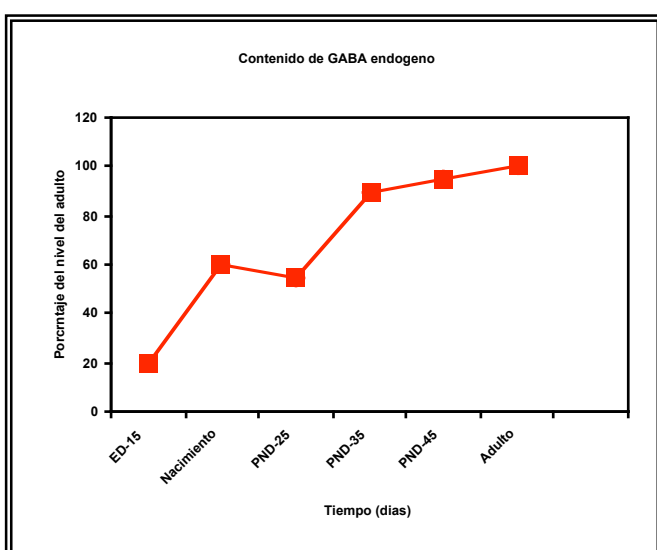
El GABA, como veíamos al principio de este capítulo, es de los primeros neurotransmisores en aparecer, solo precedido por las monoaminas: Serotonina, noradrenalina y dopamina⁵⁹. En el momento del nacimiento el GABA ya esta presente en un nivel del 60% aproximadamente del que habrá en el adulto²⁹. El GABA presenta un máximo de concentración en el en ciertas áreas PND-20⁵⁹, mientras sigue aumentando o disminuyendo en otras. El GABA va ir aumentando su concentración a lo del periodo postnatal hasta que alcanza su máxima concentración en SNC durante la infancia⁵⁹. Según diversos autores en este periodo postnatal el sistema GABAérgico va ir madurando hasta que al final de la tercera semana de vida en PND-21, cuando estaría anatómicamente maduro⁵⁶. Con lo que respecta al marcador GAD, enzima de síntesis, el número de terminales nerviosas GABAérgicas, se incrementan linealmente durante el primer mes de vida postnatal en zonas como el estriado y en la corteza⁶⁰.

Desde el punto de vista bioquímico hay un cambio en las concentraciones de diversos iones – como el cloro que disminuye - y de aminoácidos – como el GABA – que progresivamente van aumentando hasta llegar a la maduración,

alcanzándose los niveles del animal adulto en el día postnatal PND-21⁶¹.

Los datos obtenidos del trabajo de Coley et al²⁹, nos permite ver los niveles endógenos de GABA hasta alcanzar los niveles del adulto, en el grafico adjunto.

Figura 3.22.



Además tenemos que tener en cuenta que la sinaptogénesis inhibitoria tiene lugar fundamentalmente en este periodo postnatal, mas concretamente en el periodo juvenil^{56, 62} – desde PND-11 hasta PND-16 – y que el sistema GABAérgico se considera que esta anatómicamente maduro al final de la 3ª semana de vida postnatal, es decir PND-21⁵⁶. Este dato global sin embargo tiene excepciones ya que según las áreas estudiadas, hay zonas que alcanzan el nivel del adulto antes que otras, como veremos posteriormente.

Resumiendo, podemos esquematizar la maduración del GABA en el periodo postnatal en dos fases:

- Fase I: Aumento de la concentración del GABA hasta alcanzar los niveles del animal adulto entre PND-21 y PND-28.
- Fase II: Sinaptogénesis GABAérgica, con un pico máximo entre PND-11 y PND-16, llegando a los niveles de adulto en PND-21.

Coordenadas espaciales

Lo primero que llama la atención al trabajar en la maduración del sistema GABAérgico durante el periodo postnatal, es la aparición de un gradiente en la concentración del GABA endógeno, con una dirección caudo-rostral⁵³, que también ocurre con la enzima de síntesis, la GAD⁵⁴.

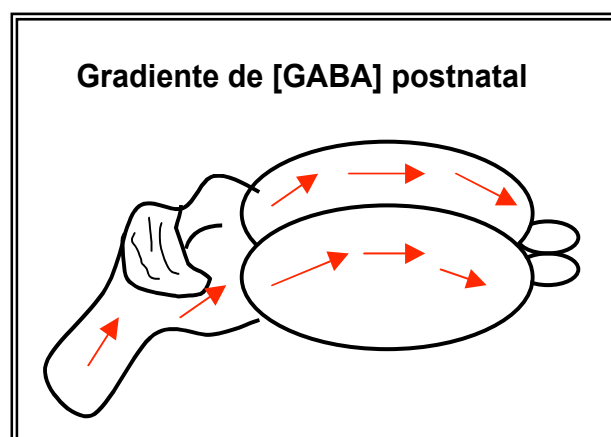


Figura 3.23.

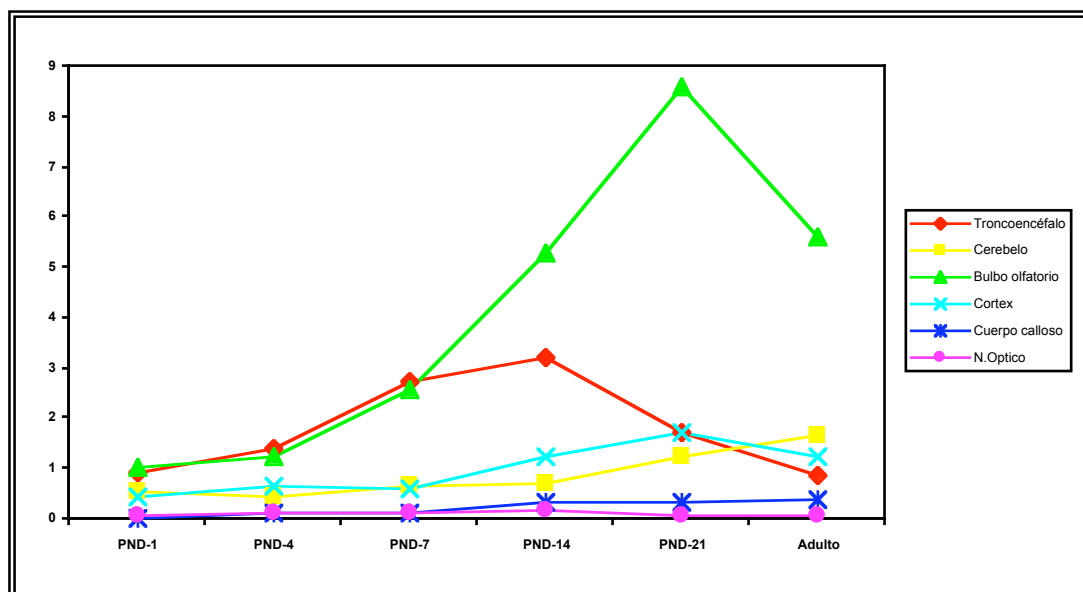
Como mencionamos anteriormente al hablar de las coordenadas temporales, anatómicamente no todas las áreas han madurado simultáneamente. En el momento del nacimiento encontramos unas altas concentraciones de GABA endógeno en sistema límbico, mesencéfalo, tronco del encéfalo y medula espinal⁵³. En estas áreas concretas entre PND-1 hasta PND-7, los niveles de

GABA van decreciendo, para luego aumentar paulatinamente hasta PND-60, fase en la cual exceden a los niveles de los neonatos en todas las áreas cerebrales excepto en la medula espinal⁵³.

En el trabajo de Florian et al⁶³, observamos como cambia la concentración de GABA a lo largo del periodo postnatal en diferentes áreas cerebrales como el tronco del encéfalo, el nervio óptico, el bulbo olfativo o el cortex.

[GABA]	PND-1	PND-4	PND-7	PND-14	PND-21	ADULTO
Tronco-encéfalo	0,91	1,36	2,73	3,21	1,70	0,85
Cerebelo	0,55	0,45	0,62	0,71	1,02	1,63
Bulbo olfativo	1,00	1,21	2,56	5,27	8,55	5,57
Cortex	0,44	0,63	0,60	1,25	1,68	1,24
Cuerpo calloso	n.d.	0,10	0,10	0,30	0,33	0,36
Nervio Óptico	0,07	0,10	0,09	0,15	0,07	0,07

Concentración de GABA en diferentes áreas cerebrales y diversos momentos del desarrollo. Expresado en $\mu\text{mol/gr}$ peso húmedo⁶³. Estos datos los podemos interpretar mejor si los vemos en forma de gráfico. Figura 3.24.



Así mismo se da una correlación bastante clara entre el aumento de concentración de GAD y el re-captador del GABA de alta afinidad, con la maduración del sistema nervioso central en diferentes áreas cerebrales como: cerebelo, colículo superior, hipocampo, estriado, corteza visual, corteza frontal sensorimotora y corteza prefrontal⁶⁴, y como hemos dicho anteriormente la excepción es la disminución en los niveles de la medula espinal^{53, 64}.

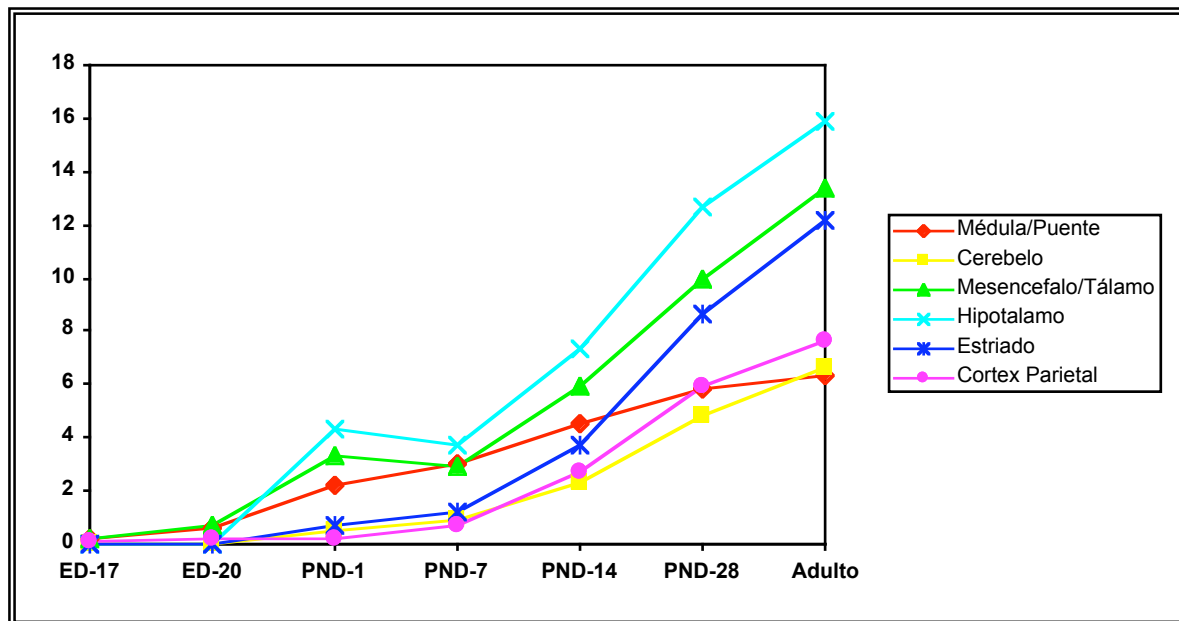
Con lo que respecta a la enzima de síntesis, GAD, también podemos observar un patrón madurativo a lo largo de la etapa postnatal en las diferentes áreas cerebrales, como pone de manifiesto los datos del trabajo de Coley et al²⁹:

ÁREA EDAD	MEDULA PUENTE	CEREBELO	MESEN- CÉFALO TÁLAMO	Y HIPO- TÁLAMO	ESTRIADO	CORTEZA PARIETAL
ED-17	0,21±0,02		0,19±0,01			0,10±0,01
ED-20	0,60±0,05		0,72±0,04			0,20±0,01
ED-22/PND-0	2,22±0,29	0,51±0,02	3,28±0,29	4,29±0,11	0,75±0,28	0,21±0,01
PND-7	3,00±0,11	0,92±0,04	2,91±0,10	3,69±0,04	1,18±0,21	0,71±0,04
PND-14	4,50±0,21	2,30±0,14	5,93±0,23	7,39±0,50	3,72±0,31	2,72±0,18
PND-28	5,88±0,05	4,86±0,12	9,98±0,15	12,63±0,32	8,68±0,76	5,98±0,21
Adulto	6,35±0,18	6,61±0,20	13,38±0,32	15,88±0,28	12,17±0,23	7,68±0,23

Actividad de la GAD en diferentes áreas del cerebro de la rata durante el desarrollo. Todos los datos están expresados en valores de nmoles/mg peso húmedo h⁻¹,²⁹.

De nuevo los datos se interpretan mejor si los vemos en forma de gráfico:

Figura 3.25.



Coordenadas funcionales

Decidimos incluir un apartado sobre la función de GABA en el periodo postnatal, mas específicamente sobre “*el cambio de función*” del GABA a lo largo del periodo postnatal. Cuando comenzamos a realizar este trabajo la idea fundamental en la que nos basábamos era que el GABA actuaba como el neurotransmisor inhibitor mas importante del cortex de vertebrados, ya que esto es lo que ocurre en el animal adulto. Pero los trabajos de Cherubini y sus colegas, en los años noventa, demostraron claramente que el GABA producía despolarización en la membrana postsináptica en el periodo de desarrollo⁶⁵. Este cambio de función del neurotransmisor supuso un cambio conceptual radical en nuestra visión del GABA. En el capítulo siguiente, durante la discusión exploremos con mas profundidad el significado que podría tener este hecho tan singular.

Durante la organización funcional del S.N.C., las neuronas pasan por diferentes momentos, siendo probablemente uno de los mas críticos el momento en el cual

una célula abandona el ciclo celular, dejando atrás su etapa de neuroblasto para convertirse en una neurona, tomando una serie de decisiones cruciales como el fenotipo del neurotransmisor que va a expresar; ello condiciona sus propiedades neuro-químicas y los circuitos que establecerá, ya sean de proyección si expresa ácido Glutámico, como locales si expresa GABA⁶⁶. Ya desde el inicio existe una regionalización, al menos en el neocórtex, donde una neurona expresa uno u otro NT en función de su lugar de origen. Las neuronas que expresan ácido Glutámico se producen en el palio dorsal, frente a las que expresan GABA que lo hacen en la cresta medial del telencéfalo ventral y en la eminencia ganglionar medial⁶⁷, como veíamos en los días gestacionales previos.

Las neuronas que expresan GABA se van a comprometer en un proceso que terminará con el establecimiento de un sistema de inhibición maduro en el animal adulto. Pero la función inhibitoria mediada sinápticamente en el SNC pasa por profundas transformaciones durante el periodo de desarrollo postnatal temprano. Durante este periodo de vida postnatal el GABA va a cambiar su papel, ya que hasta este momento había producido una despolarización en la membrana postsináptica, pero a partir de este momento va a comenzar a producir hiperpolarización.

En esta transformación van a participar numerosos actores y coincide temporalmente con un momento de máxima sinaptogénesis en el sistema: se va a producir tanto a nivel maduración funcional de la inhibición per se⁶⁸, a nivel bioquímico o molecular con todas las macromoléculas implicadas en el proceso de generación de un potencial inhibitorio, como los receptores del GABA, los recaptadores, etc⁶⁹. En general se acepta que estos cambios bioquímicos en el papel de excitador a inhibitor del GABA, sean debidos a cambios en la composición de las sub-unidades de los receptores GABA-A y GABA-B⁵⁶.

Estos cambios funcionales del GABA^{56, 97} a lo largo de este periodo que hemos ido esbozando en las distintas áreas y según los diferentes autores solo los

nombramos en este apartado, ya que en la discusión de esta tesis podremos exponerlo, cuando analicemos con mas detalle la significación biológica de este cambio de actividad – despolarizante a hiperpolarizante – que se produce en la célula postsináptica.

Así mismo, a la clásica función de neurotransmisor inhibidor en la corteza cerebral de mamíferos adultos, al GABA se le han atribuido además otras funciones. Durante este periodo postnatal se ha visto que puede actuar especialmente como promotor de la sinaptogénesis y regulador tanto del desarrollo como de la función de la corteza cerebral. Esta otra vertiente funcional del GABA tiene su momento clave durante este periodo de desarrollo postnatal, momento de máxima sinatogénesis cortical^{56, 62, 70}, como veíamos anteriormente.

Periodo neonatal. Día postnatal 1: PND-1

Como veíamos anteriormente, al nacimiento, la concentración de GABA en todo el cerebro en general, y en la mayoría de las áreas en particular, es aproximadamente el 60% de los niveles del adulto. Aunque este dato global puede variar dependiendo de las zonas, y existen excepciones como la medula espinal y el puente, donde ya se han alcanzado los niveles del adulto²⁹. Si se compara con la concentración de la enzima de síntesis GAD, parecería que existe un cierto desfase entre el desarrollo de la actividad de la enzima y la concentración del GABA en ciertas áreas; y es que la actividad de la GAD aumenta de forma lineal desde el nacimiento hasta la edad adulta²⁹ y en cambio la concentración del GABA general en cerebro se mantiene constante entre PND-1 y PND-7²⁹.

Los datos disponibles para PND-1 en las diversas áreas cerebrales los exponemos a continuación.

Medula espinal: La medula espinal, en estos primeros estadios, tiene unas características específicas^{53, 64}. Los niveles de GABA y de actividad de la enzima

de síntesis GAD no varían en paralelo entre PND-1 y PND-8⁵². En medula espinal de rata, el marcaje de la isoforma GAD67, llega a su punto máximo en PND-1 y a partir de ahí disminuye hasta alcanzar los niveles del adulto⁵. Las neuronas comisurales de la medula espinal de rata que habían expresado la GAD65 de forma temprana, durante las ultimas etapas del desarrollo embrionario habían ido disminuyendo la inmunoreactividad, mientras que el numero de estructuras terminales en los alrededores del neuropilo aumenta mucho en la zona ventral de la medula espinal⁷. Desde PND-1 y hasta PND-7, la inmunoreactividad de las células de la medula espinal – las moto-neuronas, otras neuronas del asta ventral, de la zona gris intermedia y de las capas mas profundas del asta dorsal – desaparece¹⁵ y solo se mantiene en neuronas de las capas mas superficiales del asta dorsal hasta llegar a presentar el aspecto del adulto¹⁵. Se desconoce el significado funcional de la expresión transitoria del GABA en la medula espinal de rata, pero coincide con un intenso crecimiento neurítico de las moto-neuronas, las neuronas sensoriales y de las interneuronas, así como en la formación de la placa neuromuscular¹⁵.

Cerebelo: Por sus características anatomo-funcionales, el cerebelo ha sido el sistema idóneo para el estudio de patrones de desarrollo⁷¹, por lo tanto no es de extrañar que también se haya usado para el estudio de la estructuración de los circuitos cerebrales del sistema GABAérgico⁷². La enzima de síntesis GAD se detecta desde el momento del nacimiento, especialmente la isoforma GAD67 que es la predominante en cerebelo, por su mRNA⁹⁵. En los núcleos cerebelosos profundos que maduran prenatalmente, la enzima de síntesis GAD, también se detecta a través de su mRNA, tanto para GAD65 como para GAD67, desde el momento del nacimiento en PND-1⁹⁵. Las células de estos núcleos cerebelosos profundos se empiezan a marcar con anticuerpos anti-GABA a partir de este día³⁷. Así mismo en PND-1 la inmunoreactividad al GABA de las células de Purkinje es mas intensa que en estadios anteriores³⁷. La mayoría de estas células de Purkinje ya han terminado su migración, formando una nueva capa³⁷.

Tálamo: Entre PND-1 y PND-4 se encuentran células del núcleo reticular del tálamo GABA-IR, tanto en los cuerpos celulares como en las dendritas y en perfiles identificables como conos de crecimiento, que pueden contactar con terminales no marcadas⁴⁴. Estas células GABA-IR se encuentran en este núcleo a lo largo de su parte rostrocaudal, lo cual indica que las distintas regiones del núcleo reticular – motora, límbica, somatosensorial, visual y auditiva- son GABAérgicas desde el nacimiento, no detectándose una presencia transitoria, como ocurre en otras áreas cerebrales⁴⁴. Así mismo se encuentra marcaje en el núcleo ventrobasal del tálamo pero exclusivamente en procesos axonales identificables como conos de crecimiento, perfiles ricos en vesículas y terminales sinápticas⁴⁴.

Todas las neuronas del núcleo reticular del tálamo son neuronas GABAérgicas y también positivas para la parvoalbúmina, una proteína que liga calcio y que frecuentemente se presenta asociada con la transmisión GABAérgica⁷³. En el núcleo reticular del tálamo se detectan cambios en la inmunoreactividad de las células parvoalbúmina PV(+) a lo largo del desarrollo⁵⁸. Este núcleo es una fina lamina de células a través de la cual pasan fibras tálamo-corticales y cortico-talámicas, situado entre los núcleos talámicos y la cápsula interna y esta compuesto por células GABAérgicas que sinaptan con ambos tipos de fibras. Este núcleo participa en el sistema de retroalimentación negativa que controla la información transferida desde el tálamo a la corteza en los ciclos de sueño y vigilia. El patrón que se detecta es de aumento del número de células marcadas desde PND-1(aunque en el trabajo original esta como PND-0 hemos usado el criterio al inicio de este capítulo de nombrar el día del nacimiento como PND-1) hasta PND-30 en un patrón que va desde el centro hacia la periferia, siendo en las partes dorsales y ventrales en las que aparece en PND-30. En este momento PND-30 se detecta un patrón de distribución homogéneo por todo el núcleo reticular del tálamo⁵⁸.

Con técnicas de inmunotinción otros autores también consiguen detectar GABA en este núcleo reticular del tálamo desde el nacimiento, y nos describen su presencia a nivel celular, estando presentes en cuerpos celulares, en dendritas,

conos de crecimiento y en algunas terminales sinápticas⁷⁴. En cambio en el núcleo ventrobasal del tálamo detectan marcaje de GABA, en ratas recién nacidas en los procesos axonales como conos de crecimiento, perfiles ricos en vesículas y terminales sinápticas⁷⁴. Estos autores postulan que si en ambos núcleos las terminales GABAérgicas marcadas son tan escasas e inmaduras en el nacimiento y solo después de PND-15 son mas abundantes y maduras, el GABA debe jugar un papel importante durante el desarrollo del tálamo somatosensorial y posiblemente un papel diferente⁷⁴.

El núcleo talámico peri-reticular, son un conjunto de neuronas que se localizan en la cápsula interna, adyacentes a las células GABA inmunoreactivas del núcleo reticular del tálamo, que veíamos anteriormente. Así mismo, estas células también son PV(+) -parvoalbumina inmunoreactivas-. Sin embargo, en este núcleo solo aparecen escasas células GABA(+) en la primera semana de vida postnatal para posteriormente desaparecer, teniendo una presencia transitoria⁷⁵.

En algunos estudios del desarrollo postnatal GABAérgico de las proyecciones directas tálamo-corticales desde la zona incierta del tálamo ventral hasta la zona de la corteza somatosensorial de la rata de representación de los bigotes, se puede decir que la zona incierta tiene una citoarquitectura que hace posible que se pueda distinguir de sus vecinos desde PND-1⁷⁶.

Hipocampo: Una estructura como el hipocampo ha sido ampliamente estudiada desde diversas perspectivas, y en concreto de los neurotransmisores y los circuitos que se van creando a lo largo del desarrollo postnatal⁷⁷. Cuando estudiamos la presencia del GABA, descubrimos que las neuronas GABAérgicas presentes, tanto del giro dentado como del Cuerno de Amon, han sido generadas prenatalmente⁷⁸. En hipocampo de rata, el patrón de marcaje de células GAD67 positivas es muy similar a ED-21 con fibras que contienen enzima y varicosidades tanto en CA1 y CA3. Esto mismo ocurre con GAD65 con un cambio en el patrón de marcaje, desde los cuerpos celulares hacia el plexo de fibras y los engrosamientos terminales⁴⁵. El patrón de marcaje de las dos

isoformas de GAD en el hipocampo de rata en desarrollo postnatal temprano difiere considerablemente del patrón de marcaje de terminales del animal adulto, siendo esta diferencia particularmente evidente para GAD65 en CA3⁴⁵. La distribución de las células GABAérgicas y de la enzima GAD es homogénea en todos los días estudiados, excepto en PND-4 donde aparecen como agrupaciones en CA3 y CA1⁷⁸. En estudios funcionales con sensores intracelulares en cortes de tejido de CA3 entre PND-1 (en artículo original como PND-0) y PND-8, se obtiene una respuesta que puede ser atribuida al GABA⁷⁹. Según estos autores las neuronas GABAérgicas que inicialmente estaban localizadas en las capas profundas y superficiales, progresivamente desaparecen⁷⁹. A nivel funcional entre PND-1 y PND-6 ya se observan en células piramidales de CA3, unos potenciales gigantes despolarizantes espontáneos que son producto del GABA actuando sobre receptores GABA y modulado presinápticamente por receptores NMDA⁹⁷.

Corteza: Con la excepción de las neuronas de aparición temprana de la capa I de la corteza, las neuronas inmunoreactivas al GABA corticales siguen un patrón de secuencia dentro-fuera: es decir las neuronas generadas primero se sitúan en las capas profundas de la corteza y las neuronas generadas posteriormente migran hacia zonas mas superficiales⁴⁰.

En PND-1, la mayoría de las células GABA-IR están localizadas en la capa I y unas pocas en la capa VI, especialmente en la porción mas profunda, es decir en VIb⁴⁰. Las células GABA-IR de la capa cortical VIb ya se muestran morfológicamente maduras²⁸. Por encima de la capa VIb, las células GABA-IR presentes en las capas corticales derivadas del estrato cortical también son abundantes²⁸. La sustancia blanca se ha hecho ya patente en el lugar que ocupaba la zona intermedia en los estadios previos: una de las características de la sustancia blanca es la abundancia de fibras axónicas que muestran reactividad al GABA²⁸. Intercaladas entre estas fibras aparecen algunas células GABA-IR pero con una intensidad de tinción baja y prácticamente no son visibles a partir de PND-6, estas células podrían formar parte de la población de células intersticiales

de la sustancia blanca²⁸. Además existe una abundante pero transitoria población de neuronas GABAérgicas trascallosas⁸⁰. En la corteza cerebral madura, las conexiones interhemisféricas a través del cuerpo calloso parecen ser esencialmente excitadoras pero durante esta fase final del desarrollo embrionario y el inicio del periodo postnatal la inmuno-citoquímica revela numerosas fibras GABAérgicas que posteriormente desaparecen⁸⁰.

En PND-1 hay presentes grandes poblaciones de neuronas GABAérgicas presentes en el sub-estrato, la zona intermedia inferior, y en las capa I, V, VI del estrato cortical en desarrollo.

Las células de la corteza prefrontal medial entre PND-1 y PND-15 del estrato cortical se muestran menos diferenciadas que las de las capas mas profundas⁸¹. En PND-10 aparecen mas maduras y de aspecto multipolar. Además en estos bloques temporales también hay un aumento del numero de células entre PND-1 y PND-5 hay un incremento del 50% en la densidad de las células que contienen GABA en la lámina superficial, mientras que hay un descenso general en las laminas mas profundas⁸¹. Estos datos ponen de manifiesto la maduración progresiva del sistema GABAérgico intrínseco de la corteza prefrontal medial de la rata, siguiendo el clásico patrón de "dentro-fuera", que se extenderá durante las 3 primeras semanas de vida postnatal⁷⁶.

En PND-1 las neuronas GABAérgicas de corteza visual de rata que nacieron en ED-16 han llegado a VIa⁴⁰ y su distribución se mantiene constante hasta PND-30; lo cual quiere decir que la migración de estas neuronas esta completada el día del nacimiento, sin embargo otros autores indican que la migración se habría completado para ED-21, es decir un día antes⁴⁰. Por otro lado las neuronas GABAérgicas que nacieron en ED-19 y están destinadas a las capas II/III aun no han terminado de migrar en PND-1⁴⁰.

Entre PND-1 y PND-7 existe también un marcado incremento de la densidad del marcaje de terminales axo-somáticas tanto a nivel superficial - 200% - como en laminas mas profundas -116%- ⁸¹.

Otros sistemas:

Retina: En retina de rata en el momento del nacimiento ya se detecta la presencia de GABA, pero es baja en comparación con el ácido Glutámico⁸², pero el GABA tiene una clara distribución en neuronas, en concreto se localiza en células amacrinas dispersas⁸³.

Bulbo olfatorio: En un trabajo realizado con neuronas postnatales del bulbo olfatorio de rata, se estudio la presencia de TH como marcador de células catecolaminérgicas y GAD como marcador de células GABAérgicas, además se trataron las células con un antisuero para el GABA. Se observó que todas las neuronas estudiadas, entre PND-1 y PND-7, presentan un fenotipo TH(+) y GABA(+) simultáneamente. Este tipo de respuesta no se mantiene en animales de mas edad, ya que en solo un 90% aproximadamente de las células TH(+) continúan siendo positivas para el GABA en estadios posteriores⁸⁴.

Colículo superior: En PND-1 la recaptación del GABA de alta afinidad es igual que en el adulto tanto en el colículo superior como en el cuerpo geniculado lateral. Sin embargo en corteza visual solo era un 50 % del nivel del adulto⁸⁵.

Núcleo rostral del tracto solitario: Parece que el GABA juega un papel muy importante en el procesamiento de la información gustativa del núcleo rostral del tracto solitario. Entre PND-1 y PND-7 se detecta GABA pero en menor cantidad que en ningún otro momento de su desarrollo posterior. En PND-1 solo un 20% de las sinapsis - por otro lado escasas - son GABA-inmunoreactivas⁵⁴. Los resultados de este estudio demuestran que el sistema trigeminal de la rata contiene rutas de polaridad opuesta y paralelas talámico-corticales emergiendo en el tálamo; en posición dorsal para las glutaminérgicas y por lo tanto excitadoras y en posición ventral para las GABAérgicas - inhibitorias, desde el día del nacimiento⁷⁶.

Órgano de Corti & Oliva Inferior: En un estudio realizado con inmunocitoquímica de la enzima GAD, en el Órgano de Corti de la rata, se detectan en PND-1 fibras positivas eferentes laterales olivo-cocleares en la zona basal, del haz de fibras internas espirale⁸⁶. En la zona apical se detectan en PND-3⁸⁶. La innervación GABAérgica de la Oliva Inferior fue estudiada también con anti-suero de GAD, apareciendo axones GAD(+) de baja densidad en PND-1, en las regiones periolivares e interlamelares⁵¹. El patrón inmaduro indica que las proyecciones GABAérgicas alcanzan la oliva inferior justo antes del nacimiento y que gran parte de la sinaptogénesis y del establecimiento del patrón adulto de organización ocurre postnatalmente. Se podría resumir de la siguiente manera:

1. PND-1 y PND-5: Patrón inmaduro ya que el marcaje GAD(+) no está confinado en las terminales axónicas como en la rata adulta.
2. PND-7 y PND-10: Patrón intermedio ya que durante este periodo el marcaje de GAD(+) comienza a mostrar un patrón axoplásmico, además hay un aumento rápido en el número de terminales marcadas.
3. PND-10 y PND-15: En este último periodo se llega a un patrón de innervación GABAérgica de la Oliva Inferior de tipo adulto.

Dimorfismo sexual: El sistema GABAérgico es sexualmente dimórfico en ciertas áreas cerebrales y puede estar regulado por la testosterona, aunque solo en ciertas ventanas temporales específicas, o periodos críticos, lo cual puede tener un impacto en la organización de ciertos circuitos⁸⁷. La cuantificación del mRNA de la GAD, limitante de la síntesis de GABA, en PND-1 los machos tienen niveles significativamente más altos que las hembras en el núcleo dorsomedial, el núcleo arcuado y en la región CA1 del hipocampo^{88, 89}.

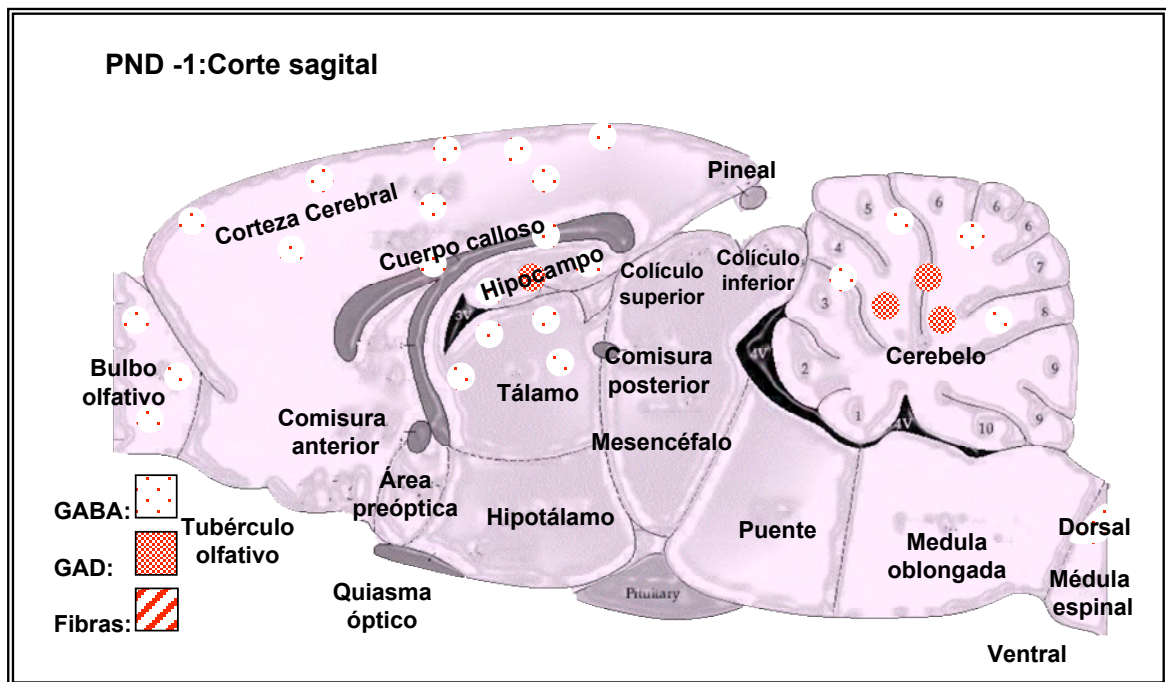


Figura 3.26.

Periodo neonatal: PND-2 / PND-7

Día postnatal 2º - PND-2: En ciertas áreas del tronco del encéfalo, como el subnúcleo ventrolateral del núcleo del tracto solitario, el núcleo ambiguo, el núcleo hipogloso, el núcleo medial accesorio de la oliva, núcleo motor dorsal del vago y el núcleo cuneado, que expresaban GABA, van a comenzar a partir de PND-2 a descender su expresión paulatinamente hasta llegar aun mínimo en PND-21, este descenso GABAérgico va acompañado por un aumento de transmisión glicinérgica⁹⁰.

En cerebelo, las células en cesta que se generan en PND-2 ya tienen terminaciones que son inmunoreactivas al GABA³⁷.

El numero de células GABA inmunoreactivas de la corteza se han incrementado en las capa I y VIb⁴⁰. Además son evidentes células GABAérgicas en las capas V y VIa y solo raramente aparecen en el estrato cortical⁴⁰.

Las células que nacieron en ED-19, en PND-2 están localizadas en el borde del estrato cortical, aunque aun quedan algunas situadas en la zona inferior del estrato cortical y en el subestrato⁴⁰.

Día postnatal 3º - PND-3: En cerebelo, la molécula del GABA, se detecta en distintos tipos de células y en diferentes momentos del desarrollo; se ha encontrado presencia de GABA en las células granulares en PND-3⁷², en esta capa granular del cerebelo, se detecta el neurotransmisor 2-3 días antes de que se detecte la expresión del receptor GABA-A⁹¹ en PND-5⁷²; se piensa que el receptor lo hace solo después de haber completado la migración celular y una vez que las dendritas han entrado a formar parte de circuitos sinápticos específicos, que incluyen la inervación de aferentes GABAérgicas⁷².

En la retina los niveles de GABA detectados en el nacimiento se mantienen hasta PND-3 momento en el cual aumenta paulatinamente hasta llegar a los niveles de adulto en el proceso de desarrollo⁸².

Las células del hipocampo que habían sido detectadas en ED-18, fundamentalmente en zonas intermedias y marginales han ido evolucionando y en este momento ya se encuentran repartidas por todo el hipocampo, localizándose las neuronas GABAérgicas en el stratum oriens y en el stratum radiatum³². En PND-3 se detecta una prominente población de células que nacieron en ED-14 y que son positivas para el m-RNA GAD67, en la capa granular en desarrollo²⁴.

En un estudio realizado con inmunocitoquímica de la enzima GAD, en el Órgano de Corti de la rata, se detectaban en PND-1 fibras positivas eferentes laterales olivo-cocleares en la zona basal, del haz de fibras internas espirales, y en la zona apical se comienzan a detectar en PND-3⁹².

Día postnatal 4º - PND-4: Trabajando en el hipocampo trabajos iniciales en esta área, situaban las primeras células GABA(+) en PND-4, pero había que esperar hasta PND-6 para empezar a detectar células GAD(+), y era en PND-14 cuando se igualan ambas poblaciones⁷⁸, estudios posteriores adelantan esta aparición, como hemos visto anteriormente en periodos pre y postnatales.

En PND-4 han aparecido células corticales GABA-inmunoreactivas en la capa III⁴⁰. Las células GABA-inmunoreactivas que nacieron en ED-19 destinadas a las capas II/III, están en este momento casi todas en el borde del estrato cortical⁴⁰.

Día postnatal 5º - PND-5: En cerebelo, las células de Purkinje presentan marcaje con anticuerpos anti-GABA positivos en los procesos peri somáticos³⁷.

Entre PND-5 y PND-9 en el núcleo reticular del tálamo el marcaje es esencialmente el mismo que el anterior periodo, con un intenso marcaje GABA-IR sobre los cuerpos celulares, las dendritas y los conos de crecimiento mientras que las terminales son muy escasas, así mismo encontramos marcaje intenso en perfiles axónicos de células del núcleo ventrobasal del tálamo⁴⁴.

En corteza, casi todas las neuronas de la capa I en desarrollo van adquiriendo inmunoreactividad al GABA en diferentes grados hacia PND-5³⁵. Estas neuronas se identifican como células Cajal-Retzius, pertenecientes aun mismo grupo, aunque presentes diversos tamaños y formas³⁵.

Día postnatal 6º - PND-6: El GABA per se, por primera vez se detecta en células de Golgi de cerebelo en PND-6⁹³.

En la corteza han aparecido células GABA-inmunoreactivas en la capa II⁴⁰.

En el cuerpo calloso hay una expresión transitoria de axones con inmunoreactividad de tipo GABAérgica en la zona subcortical de la sustancia blanca, pero esta inmunoreactividad se detecta por ultima vez en PND-6⁹⁴.

Día postnatal 7º - PND-7: Desde el punto de vista del entorno iónico, el GABA estimula la captación de Cloro en sinaptoneurosomas, alcanzando su nivel máximo entre PND-7 y PND-14, niveles que luego se van a mantener constantes a partir de ese momento⁴⁸.

Llegado este momento del desarrollo postnatal el patrón de distribución de la isoforma de la enzima GAD65 en la comisura ventral de la medula espinal de rata es similar a la descrita en el animal adulto⁷. La expresión transitoria del GABA en la medula espinal de la rata alcanza entre PND-7 y PND-10 su máximo porcentaje de células GABA-positivas que es en este momento del 50%¹¹.

En cerebelo la isoforma GAD65, que es la menos abundante, se detecta a través de su mRNA solo a partir de PND-7 en células de Purkinje, aunque

posteriormente aparecerá en otras células GABA⁹⁵. La transmisión GABAérgica en células granulares cerebelosas se ha estudiado con detalle en este primer periodo de vida postnatal, observándose que la transmisión sináptica mediada por el GABA y por el receptor GABA-A, produce corrientes postsinápticas discretas y espontáneas que se incrementan desde un 5% en PND-7 hasta un 99% en PND-21⁹⁶. Además se observa que en PND-7 estas corrientes postsinápticas son despolarizantes, generándose ocasionalmente un potencial de acción, en cambio para PND-18 el potencial de inversión del GABA, cambia y casi alcanza el potencial de reposo y la conductancia del GABA cambia y se produce una maniobra de inhibición⁹⁶. Volveremos sobre este tema en la discusión de los resultados.

Desde PND-7 los cuerpos neuronales GABAérgicos aparecen repartidos por todo el hipocampo, pero las terminales GABA inmunoreactivas no son frecuentes hasta el final de la 2ª semana de vida postnatal, es decir, PND-14⁷⁹. Es durante la segunda semana de vida postnatal, cuando la respuesta del GABA cambia de despolarizante a hiperpolarizante y la bicuculina induce descargas espontáneas intersticiales. Esto puede sugerir que la retroalimentación positiva de las neuronas gabaérgicas sobre las neuronas piramidales durante la primera semana de vida, pueden tener un efecto sobre la generación de potenciales GDPs que tengan un papel importante en la sinaptogénesis. Además hacia el final de la 1ª semana en PND-7 y en concomitancia con el cambio de respuesta que se empieza a observar en el GABA de despolarizante a hiperpolarizante, comienzan a aparecer conexiones glutaminérgicas funcionales⁹⁷.

En corteza al final de la primera semana de vida, PND-7, la capa I cortical ya tiene un sistema de fibras GABAérgico establecido³⁵; además un número moderado de neuronas se localizan en la línea intermedia entre la capa I y el estrato cortical que está por debajo, sugiriendo la migración de algunas neuronas GABAérgicas desde esta capa marginal hacia capas más profundas³⁵.

La densidad de las proyecciones incerto-corticales – tálamo, desde la zona incierta-corticales - alcanza su máximo entre PND-7 y PND-14 de vida postnatal, para descender luego paulatinamente hasta llegar al patrón del adulto. Además se

puede afirmar según estos autores que la mayoría de estas proyecciones derivan de células GABAérgicas⁹⁴.

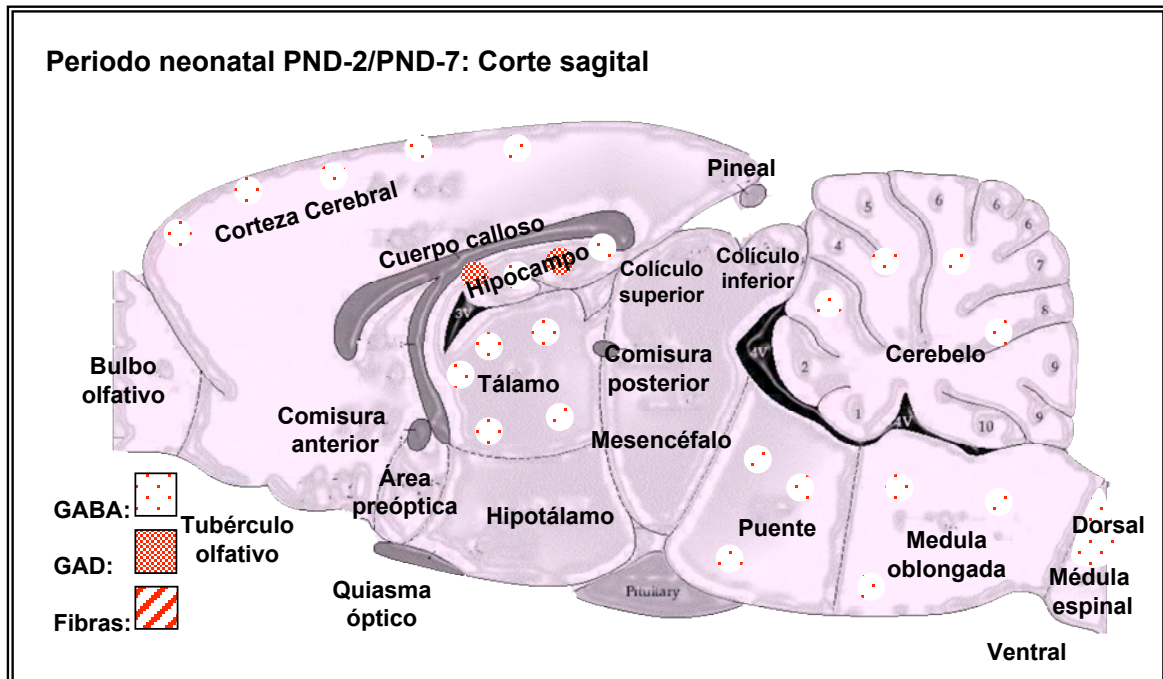


Figura 3.27.

Periodo inmaduro: PND- 8 / PND-14

Día postnatal 8º - PND-8: Como veíamos anteriormente, los niveles del GABA y de la enzima GAD no eran paralelos en medula espinal de rata, pero a partir de PND-8 si se comienza a establecer esa correlación entre los niveles de GABA y la actividad de síntesis de la enzima de síntesis GAD en células del área dorsal de la medula - vías de entrada de información o aferentes - frente al descenso observado en áreas ventrales - vías de salida de información o eferentes⁵².

La retina de rata en PND-8 ya presenta un aspecto morfológicamente maduro, PND-8 existe diferencias en el turnover de NT en la retina inmadura⁸³.

Día postnatal 10º - PND-10: Las células de Purkinje desarrollan dendritas terciarias, lo cual aumenta la inmunoreactividad³⁷. A partir de PND-10 la intensidad del marcaje del soma y las dendritas de las células de Purkinje

gradualmente decrece y en cambio su terminación axónica en los núcleos cerebelosos profundos se vuelve mas intensamente inmunoreactiva³⁷. Las células de Lugano que se forman entre PND-8 y PND-13 comienzan a mostrar marcaje en PND-10³⁷. Algo similar ocurre con las células de Golgi, el marcaje en las dendritas es máximo en PND-10 y luego disminuye concomitantemente con el aumento en el axón o terminales axónicas³⁷.

Entre PND-10 y PND-15 las células del núcleo reticular del tálamo presentan un claro marcaje en los cuerpos celulares, confirmando los datos expuestos anteriormente⁴⁴. Las dendritas aparecen además con un patrón claro de GABA-IR en las terminales con pequeñas vesículas que contienen una o dos mitocondrias⁴⁴. En este periodo en el núcleo ventrobasal del tálamo las terminales con aspecto maduro ya son muy numerosas⁴⁴.

En el núcleo rostral del tracto solitario como veíamos anteriormente en PND-1 solo un 20% de las sinapsis - por otro lado escasas - son GABA-inmunoreactivas. Esta proporción se dobla cuando se alcanza el nivel del adulto en PND-10⁵⁴.

En el neocortex de la rata en la primera semana de vida postnatal ya se han descrito IPSPs generados tanto por GABA endógeno como por aplicaciones exógenas, pero los potenciales evocados no aparecen antes de PND-10⁹⁸. Durante el periodo de máxima sinaptogenesis entre PND-11 y PND-20 se desarrolla la inhibición mediada por el GABA⁹⁸.

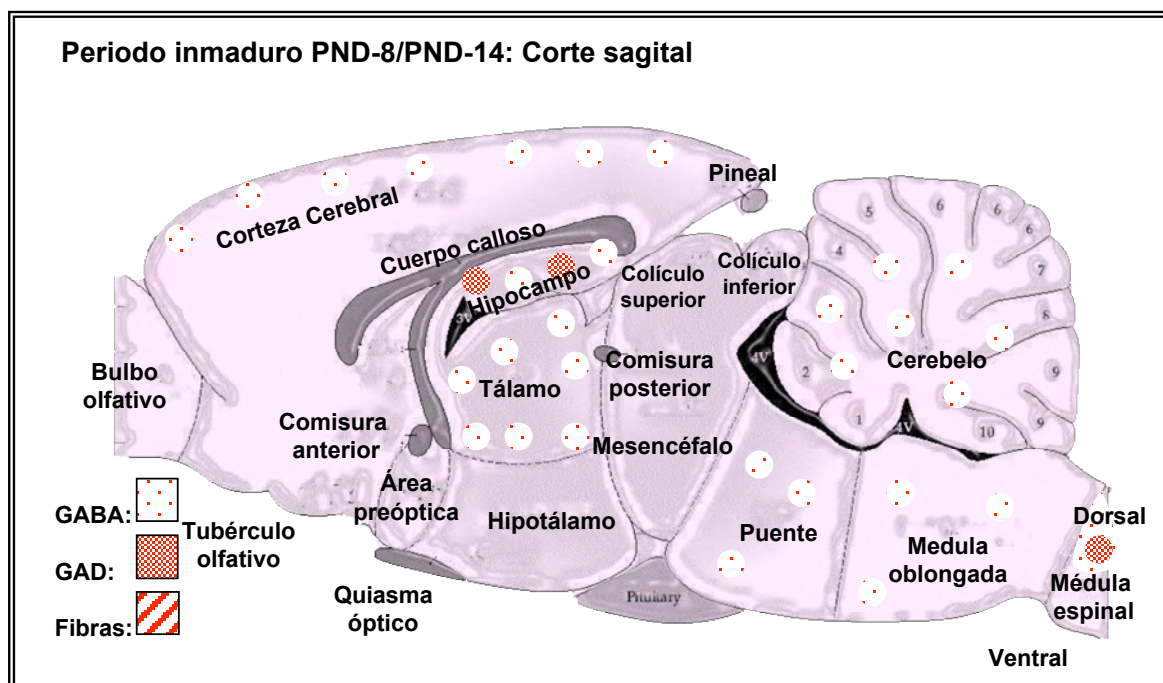
Las células de la corteza prefrontal medial entre PND-1 y PND-15 del estrato cortical se muestran menos diferenciadas que las de las capas mas profundas⁹⁹. En PND-10 aparecen más maduras y de aspecto multipolar⁹⁹.

Día postnatal 11º - PND-11: En corteza occipital de rata, el numero y la distribución de células que contienen GABA ha ido madurando desde ED-16, primer día en el cual se detectaban, pero en PND-11 ya se observa un patrón en densidad de células y en distribución de tipo adulto, que no va a cambiar en el tiempo⁴¹. Además estas células marcadas se caracterizan como interneuronas⁴¹.

Día postnatal 12° - PND-12: Aparece una distribución madura de neuronas GABA inmunoreactivas en la corteza y aunque hay células GABA en todas las capas, son mas abundantes en las capas II, III, V, VI⁴⁰. Las neuronas nacidas en ED-19 y destinadas a las capas II/III en PND-12 han llegado a la capa III⁴⁰.

Día postnatal 14° - PND-14: Desde PND-7 los cuerpos neuronales GABAérgicos aparecen repartidos por todo el hipocampo, pero las terminales GABA inmunoreactivas no son frecuentes hasta el final de la 2ª semana de vida postnatal, es decir, PND-14⁷⁹. Hay que tener en cuenta que las células granulares de la fascia dentada que son células Glutaminérgicas, se dividen fundamentalmente postnatalmente, se estima que el 85% se producen en las 3 semanas siguientes al nacimiento⁴⁴. Pero durante el desarrollo estas células granulares expresan ambos fenotipos: glutaminérgico y GABAérgico, pero cuando el desarrollo se ha completado el fenotipo GABAérgico desaparece. La expresión del fenotipo glutaminérgico maduro depende de factores programados y ambientales, ya que en cultivo las células granulares pueden volver a expresar GABA¹⁰⁰.

Figura 3.28.



Periodo adolescente: PND-15 / PND-21

Día postnatal 15º - PND-15: En cerebelo, en PND-15 las células de Purkinje aparecen claramente marcadas y solo aparece un leve marcaje en células en cesta y células estrelladas⁹³. El marcaje de las células Golgi en cambio, va disminuyendo paulatinamente y desaparecerá definitivamente en PND-25⁹³. Entre PND-10 y PND-15 las células en cesta del cerebelo, presentan tanto el soma como los procesos intensamente teñidos, las terminales axónicas de las células en cesta se detectan por primera vez en PND-15 alrededor del soma de las células de Purkinje y forman un intenso penacho hasta PND-20³⁷. Las células estrelladas se tiñen intensamente con anticuerpos anti-GABA³⁷.

En PND-15 los grandes sistemas de aferencias al tálamo - sistema cortico-talámico, y sistemas ascendentes: lemnisco, trigémino y espino-talámico - ya parecen morfológicamente maduros⁴⁴. Estas rutas que llegan al tálamo muy pronto durante el desarrollo, en animales neonatales de PND-1 aún están muy inmaduras, pero ahora ya han terminado ese proceso de maduración⁴⁴. En estos momentos el patrón de inmunoreactividad al GABA del núcleo reticular del tálamo y del núcleo ventrobasal del tálamo ya muestran un patrón sináptico organizado⁴⁴. En el hipocampo de rata se encuentran las células nacidas en ED-14 y positivas para la GAD en la base de la capa celular granular, presentando ya el patrón que encontramos en el adulto²⁴. Observamos que existe un cambio en el patrón de localización de las células GAD67 durante el desarrollo del giro dentado de la rata, cambiando entre ED-20 y PND-15 el marcaje: en los estadios embrionarios el marcaje esta localizado por encima de la capa granular, durante los estadios postnatales tempranos esta dentro de la capa y finalmente en el borde interno de la capa celular molecular²⁴.

En un estudio realizado con inmunocitoquímica de la enzima GAD, en el Órgano de Corti de la rata, se detectan en PND-1 fibras positivas eferentes laterales olivo-cocleares en la zona basal, del haz de fibras internas espirales, y en la zona apical en PND-3¹⁰¹. Posteriormente en PND-15 aparece marcador en la innervación eferente medial olivo-coclear. En estas dos regiones del Órgano de

Corti, el patrón de inmunoreactividad del adulto se alcanza para la GAD entre PND-17 y PND-18¹⁰¹.

Según la corteza va expandiéndose hay un correspondiente descenso de la densidad de células GABA inmunoreactivas en los dos tercios externos del manto cortical hasta aproximadamente PND-15, estabilizándose en 20-25 células / 10.000 micrones² para todas las laminas⁸¹. Entre PND-1 y PND-5 hay un aumento de 133% en el tamaño medio de las células marcadas, seguidas por un paulatino descenso del 30% entre PND-15 y PND-41⁸¹.

Por lo que respecta al dimorfismo sexual en PND-15, después que el periodo crítico de diferenciación sexual ha terminado, ya no se detectan las diferencias anteriores⁸⁸. Se ha visto que eran dependientes de los esteroides gonadales que regulan la GAD^{88, 102}. Cambios de esta naturaleza también se ha observado en el hipotálamo¹⁰². El estudio con otro tipo de sustancias como los gluco-corticoides, que regulan la expresión del sistema GABAérgico durante el periodo postnatal, también se ha observado que existe una respuesta diferencial entre machos y hembras¹⁰³.

Día postnatal 16º - PND-16: Hacia el final de a tercera semana postnatal, la distribución de la inmunoreactividad al GABA en el núcleo reticular del tálamo y en el núcleo ventrobasal es muy similar al que se encuentra en rata adulta⁴⁴.

Día postnatal 18º - PND-18: En cerebelo para PND-18 el potencial de inversión del GABA, cambia y casi alcanza el potencial de reposo y la conductancia del GABA cambia y se produce una maniobra de inhibición⁹⁶. Volveremos sobre este tema en la discusión de los resultados.

Las células GABAérgicas del hipocampo han seguido fundamentalmente dos gradientes de aparición: en el Cuerno de Ammon un gradiente lateromedial, mientras que en el área dentada este gradiente ha sido dorsoventral y para el PND-18 ya encontramos un patrón adulto donde las células GABAérgicas están repartidas por todo el hipocampo³². En este periodo perinatal existen momentos importantes de aumento tanto de células GABAérgicas como de células GAD(+)

entre PND-4 y PND-8 y entre PND-12 y PND-16, para llegar en PND-18 al 90% de los valores del adulto⁷⁸.

Día postnatal 20º - PND-20: La intensidad del marcaje GABAérgico en el cerebelo ya es similar al que se encuentra en PND-30 y a estadios mas tardíos³⁷. Para PND-20, día del destete según los autores de este trabajo, las células GABA inmunoreactivas que procesan la información gustativa del núcleo rostral del tracto solitario que se encuentran tienen prácticamente la misma densidad que en los adultos. Durante el desarrollo se observa una perdida desproporcionada de células que no contienen GABA⁵⁴.

Día postnatal 21º - PND-21: La expresión transitoria del GABA en la medula espinal de la rata que alcanzó entre PND-7 y PND-10 su máximo porcentaje de células GABA-positivas del 50%, llega en PND-21 al 20%, niveles que se mantienen posteriormente¹¹.

En células disociadas de medula espinal el estudio con anti-GAD-2 que había comenzado a manifestarse en ED-21 llega a unos niveles en PND-21 del 20%¹².

En los núcleos del tronco del encéfalo – núcleo hipogloso, ambiguo, cuneado, estos núcleos están directamente o indirectamente implicados en el control respiratorio – en los cuales aparece GABA durante el desarrollo pero a PND-2 había comenzado un descenso en la expresión del GABA, que termina de culminarse en PND-21⁹⁰.

Junto con el patrón expuesto anteriormente en la Oliva Inferior, el trabajo de Merchan-Pérez et al¹⁰⁵, nos confirma en PND-21 la cóclea de la rata ya muestra un patrón adulto de inmunoreactividad al GABA y a la GAD¹⁰⁴. La inervación eferente de la cóclea se origina en dos grupos de neuronas localizadas en el complejo de la oliva superior. El primer grupo – neuronas eferentes laterales – mandan su axón al Órgano de Corti y hacen sinapsis con dendritas de las neuronas auditivas primarias, que son postsinápticas a las células en cepillo internas de la cóclea. El segundo grupo – neuronas eferentes mediales – mandan su axón y sinaptan con las células en cepillo externas de la cóclea. Estas dos vías

usan el GABA como neurotransmisor en la edad adulta. En la rata en proceso de maduración coclear se detecta inmunoreactividad en PND-3 y adquiere su aspecto de adulto en PND-15 o PND-16¹⁰⁵. Todos estos resultados nos hacen pensar sobre la importancia de la aparición del GABA antes de la función de oír. Puede ser que el GABA este implicado en un efecto neurotrófico durante la maduración coclear y que tenga que participar de alguna manera en la modulación de los primeros potenciales de acción cocleares, tan pronto como estos aparezcan¹⁰⁵. Volveremos a incidir en este tema cuando veamos las implicaciones del cambio de respuesta postsináptica de despolarizante a hiperpolarizante en el último capítulo.

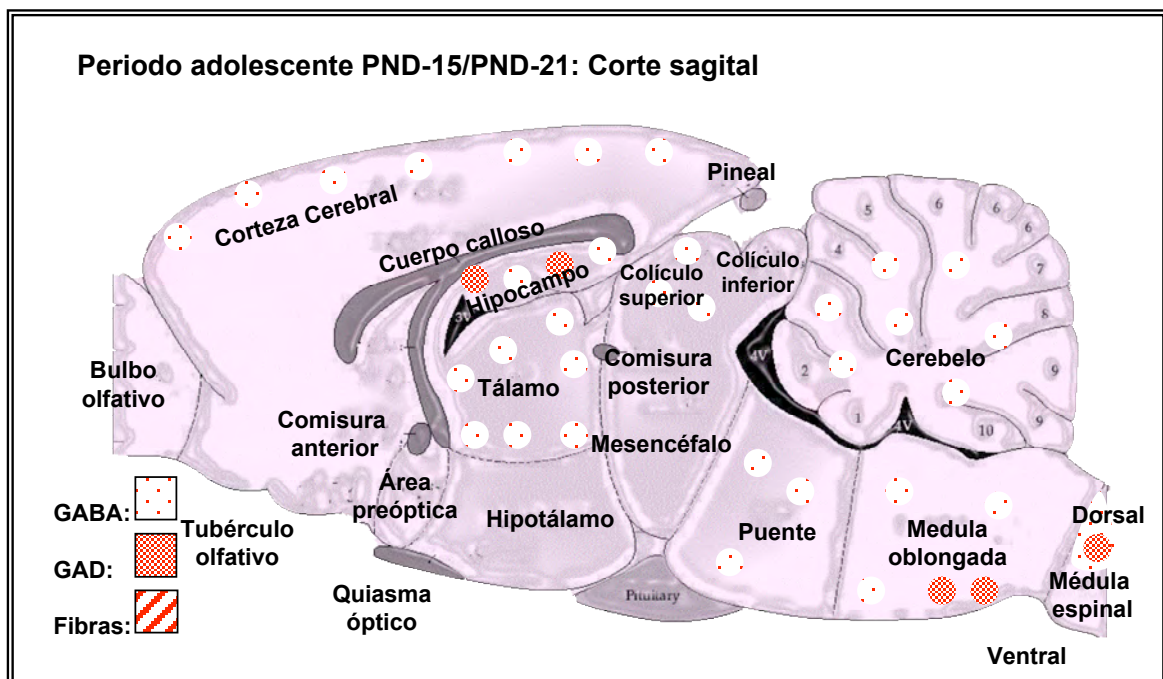


Figura 3.29.

Periodo juvenil: PND-22 / PND-28

Día postnatal 25° - PND-25: El marcaje de las células Golgi del cerebelo ha ido disminuyendo paulatinamente y desaparece definitivamente en PND-25⁹³. Es precisamente en esta fase de PND-25 cuando las células mas marcadas son las

estrelladas y las células en cesta, y sin embargo ha desaparecido de las células de Golgi y se mantiene en las células de Purkinje⁹³.

Día postnatal 28º - PND-28: Entre PND-0 y PND-28 la actividad de la enzima de síntesis ha aumentado de forma lineal de forma que en PND-28 ya ha alcanzado el 90% de los niveles del adulto²⁹.

Durante el periodo postnatal la concentración del GABA aumenta mucho en la retina y poco en otros tejidos oculares, alcanzándose los niveles de adulto en un poco después de PND-28, en PND-30¹⁰⁶. En un estudio histoquímico de localización de neuronas que contienen GABA en retina de rata, durante el desarrollo postnatal, vemos que estas se disponen a dos niveles¹⁰⁷:

- En las capas internas de la retina que van aumentando desde la infancia hasta la edad adulta. Los niveles de adulto se logran como muy tarde en PND-30 .
- En las capas externas de la retina, donde hay células horizontales que muestran un marcaje transitorio GABA(+) que desaparece a partir de PND-15.

Así mismo en el nervio óptico aparece un marcaje transitorio para el GABA durante las primeras semanas del desarrollo postnatal que se reduce mucho o incluso esta ausente en el animal adulto¹⁰⁸. Durante este periodo neonatal el nervio óptico se despolariza por la presencia de receptores GABA-A, lo cual indica que el GABA debe jugar un papel relevante en el desarrollo de mecanismos de acción en el nervio óptico de la rata.

Hasta aquí hemos mostrado los diferentes resultados obtenidos por diversos autores sobre la aparición del GABA o su enzima de síntesis en el SNC de la rata. Estos datos podrían ser completados por estudios mas exhaustivos realizados en todas las áreas y en todos los periodos embrionarios o postnatales. Se podría terminar de elaborar un mapa completo del desarrollo del sistema GABAérgico durante los periodos gestacionales, postnatales, juveniles hasta alcanzar la edad adulta. En el siguiente capítulo mostraremos las conclusiones que se pueden extraer de estos resultados.

REFERENCIAS DE RESULTADOS:

- ¹ Foster GA. Chemical Neuroanatomy of the Prenatal Rat Brain. A developmental atlas. Oxford University Press. Oxford. 1998.
- ² Lagercrantz H. Classical and "new" neurotransmitters during development- some examples from control of respiration. *Journal of developmental physiology* 1984; 6: 195-205.
- ³ Smeets W. Reiner A. Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates. Cambridge University Press. Cambridge 1994.
- ⁴ Lauder JM, Han VK, Henderson P. Verdoorn T. Towle AC. Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 1986;19(2): 465-93.
- ⁵ Somogyi R, Wen X, Ma W, Barker JL. Developmental kinetics of GAD family mRNAs parallel neurogenesis in the rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience* 1995; 15: 2575-91.
- ⁶ Fairen A, Cobas A, Fonseca M. Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *The Journal of comparative neurology*.1986; 251:67-83.
- ⁷ Phelps PE, Alijani A, Tran TS. Ventrally located commissural neurons express the GABAergic phenotype in developing rat spinal cord. *The Journal of comparative neuroscience*. 1999; 409(2): 285-98.
- ⁸ Robain O, Barbin G, Ben Ari Y, Rozenberg F, Prochiantz A. Gabaergic neurons of the hippocampus: development in homotopic grafts and in dissociated cells cultures. *Neuroscience*. 1997; 23(1): 73-86.
- ⁹ Vaccarino FM, Schwartz ML, Hartigan D, Leckman JF. Basic fibroblast growth factor increases the number of excitatory neurons containing glutamate in the central cortex. *Cerebral Cortex*. 1995; 1-64-78: 1047-3211
- ¹⁰ Tran TS, Cohen-Cory S, Phelps PE. Embryonic GABAergic spinal commissural neurons project rostrally to mesencephalic targets. *Journal comp. neurol*. 2004 Jul; 475(3): 327-39.
- ¹¹ Schaffner AE, Behar T, Nadi S, Smallwood V, Barker JL. Quantitative analysis of transient GABA in embryonic and early postnatal rat spinal cord neurons. *Brain research. Developmental brain research*.1993; 72(2): 265-76.
- ¹² Behar T, Schaffner AE, Barker JL. Immunocytochemical analysis of GAD expression in cells of the developing rat spinal cord. *Journal of cell biology* 1990; 11: 1361.
- ¹³ Walton MK, Schaffner AE, Barker JL. Sodium channels, GABA -A receptors and glutamate receptors develop sequentially on embryonic rat spinal cord cells. *Journal of Neuroscience* 1993; 13(5): 2068-84.
- ¹⁴ Gao BX, Ziskind-Conhaim L. Development of glycine and GABA-gated currents in rat spinal cord motoneurons. *The journal of neurophysiology* 1995; 74(1):113-21.
- ¹⁵ Ma W, Behar T, Barker J. Transient expression of GABA immunoreactivity in the developing rat spinal cord. *The Journal of comparative neurology*. 1992; 325:271-290.
- ¹⁶ Ma W, Behar T, Maric D, Maric I, Barker JL. Neuroepithelial cells in the rat spinal cord express glutamate decarboxylase immunoreactivity in vivo and in vitro. *Journal of comparative neurology*. 1992; 8, 325(2):257-70.
- ¹⁷ Miller MW. Cogeneration of retrogradely labeled cortico-cortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in neocortex. *Developmental brain research* 1985; 23: 187-192.
- ¹⁸ Ma W, Behar T, Schaffner A, Smith S, Barker J. Parallel expression of GABA-A receptor and GABA in embryonic rat subcortical brain. *Society of neuroscience Abstr* 1991; 17: 300. 2
- ¹⁹ Sanes DH, Ret A, Harris WA. El desarrollo del sistema nervioso. Barcelona:Ariel neurociencia; 2002.

- ²⁰ Fiszman ML, Behar T, Lange GD, Smith SV, Novotny EA, Barker JL. GABAergic cells and signals appear together in the early post-mitotic period of telencephalic and striatal development. *Brain research. Developmental brain research* 1993; 73(2) : 243-51.
- ²¹ Lui J, Morrow AL, Devaud L, Grayson DR, Lauder JM. GABA-A receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *Journal Neuroscience* 1997; 2420-8.
- ²² Amaral DG, Kurz J. The time of origin of cells demonstrating glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the rat hippocampal formation of the rat. *Neuroscience letter* 1985; 59:33-39
- ²³ Dupuy ST, Houser CR. Early appearance and generation of a prominent population of GAD67-containing neurons in the developing rat hippocampal formation. *Soc Neuroscience Abstract* 1995; 21:307.
- ²⁴ Dupuy ST, Houser CR. Developmental changes in GABA neurons of the rat dentate gyrus : an in situ hybridization and birthdating study. *The Journal of comparative neurology* 1997; 389 (3):402-18.
- ²⁵ Dupuy DS, Houser CR. Evidence for changing positions of GABA neurons in the developing rat dentate gyrus. *Hippocampus* 1999; 9(2):186-99.
- ²⁶ Van Eden CG, Mrzljak L, Voorn P, Uylings HB. Prenatal development of GABAergic neurons in the neocortex of the rat. *The Journal of Comparative neurology*. 1989; 289(2): 213-27.
- ²⁷ Behar TN, Li Y-X, Tran HT, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL. GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *The journal of neuroscience* 1996; 16(5):1808-1818.
- ²⁸ Cobas A, Fairen A, Alvarez-Bolado G, Sanchez MP. Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: a comparative study of the distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABA-A receptor. *Neuroscience* 1991; 40(2): 375-97.
- ²⁹ Coyle JT, Enna SJ. Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain. *Brain research* 1976; 111(1):119-33.
- ³⁰ Behar T, Schaffner AE, Barker JL. Immunocytochemical analysis of GAD expression in cells of the developing rat spinal cord. *Journal of cell biology* 1990; 11: 1361.
- ³¹ Chen G, Trombley PQ, Van den Pol A. GABA receptors precede glutamate receptors in hypothalamic development; differential regulation by astrocytes. *Journal of Neurophysiology* 1995; 74(4):1473-1484.
- ³² Rozenberg F, Robain O, Jardin L, Ben Ari Y. Distribution of GABAergic neurons in late fetal and early postnatal rat hippocampus. *Brain research. Developmental brain research* 1989; 50 (2): 177-87.
- ³³ Van Eden CG, Mrzljak L, Voorn P, Uylings HB. Prenatal development of GABAergic neurons in the neocortex of the rat. *The Journal of Comparative neurology*. 1989; 289(2): 213-27.
- ³⁴ Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF. Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. *Journal com. Neurol.* 2004 Feb; 469(3): 325-39.
- ³⁵ Wolf JR. Amino acids neurotransmitters: Evidence for a dual role of GABA as a synaptic transmitter and a promoter of synaptogenesis. 1st ed. Raven Press New York. 1981.
- ³⁶ Miller MW. Relationship of the time of origin and death of neurons in rat somatosensory cortex: barrel versus septal cortex and projection versus local circuit neurons. *The Journal of comparative neurology* 1995; 355:6-14.
- ³⁷ Aoki E, Semba R, Kashiwamata S. When does GABA-like immunoreactivity appear in the rat cerebellar GABAergic neurons? *Brain research* 1989; 502(2):245-51.

-
- ³⁸ Hammond C. Cellular and molecular neurobiology. 23^a ed. Academic Press 2001. p.472-484.
- ³⁹ Ovtscharoff W, Eusterschulte B, Zienecker R, Reisert I, Pilgrim C. Sex differences in the densities of dopaminergic fibers and GABAergic neurons in the prenatal rat striatum. *The Journal of comparative neurology* . 1992; 323(2): 299-304.
- ⁴⁰ Miller MW. The migration and neurochemical differentiation of gamma-aminobutyric acid (GABA)-immunoreactive neurons in rat visual cortex as demonstrated by a combined immunocytochemical-autoradiographic technique. *Developmental Brain research* 1986; (28):41-46.
- ⁴¹ Chronwall B, Wolf JR. Prenatal and postnatal development of GABA-accumulating cells in the occipital neocortex of rat. *Journal of comparative neurology*. 1980; 190(1): 187-208.
- ⁴² Alvarez-Bolado G, Swanson LW. *Developmental brain maps: Structure of the embryonic rat brain*. Amsterdam: Ed. Elsevier Science B.V.; 1996.
- ⁴³ Wu WL, Ziskind-Conhaim L, Sweet MA. Early development of glycine and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. *The Journal of neuroscience* 1992; 12(10): 3935-45.
- ⁴⁴ De Biasi S, Amadeo A, Arcelli P, Frassoni C, Spreafico R. Postnatal development of GABA-immunoreactive terminals in the reticular and ventrobasal nuclei of the rat thalamus: a light and electron microscopy study. *Neuroscience* 1997; 76, (2): 5003-516.
- ⁴⁵ Dupuy ST, Houser CR. Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early rat hippocampal formation. *The journal of neuroscience* 1996; 16(21): 6919-6932.
- ⁴⁶ Suzuki T, Takagi R, Kawashima K. Picrotoxin increased acetylcholine release from rat cultured embryonic septal neurons. *Neuroscience letters* 2004; 356: 57-60.
- ⁴⁷ Reece LJ, Lim CH. Onset of optic nerve conduction and synaptic potentials in superior colliculus of fetal rats studied in vitro. *Developmental Brain Research* 1998; 106: 25-38.
- ⁴⁸ Kellogg CK, Plegler GL. GABA-stimulated uptake and enhancement by diazepam in synaptoneurosomes from rat brain during prenatal and postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res*. 1989; 49(1):87-95.
- ⁴⁹ Warton SS, Perouansky M, Grantyn R. Development of gabaergic synaptic connections in-vivo and in cultures from rat superior colliculus. *Developmental Brain research* 1990; 52 (1-2): 95-111.
- ⁵⁰ Hahn ET, Lee JJ, Min BI, Cho YW. Developmental change of GABAergic postsynaptic current in rat periaqueductal gray.. *Neuroscience letters*. 2005; 380: 187-192.
- ⁵¹ Gotow T. et al. Postnatal development of the inferior olivary complex in the rat: Synaptogenesis of GABAergic afferents, analyzed by glutamic acid decarboxylase immunocytochemistry. *Journal of Comp. Neurology*. 1987; 263(4):526-52.
- ⁵² Saito K. et al. Postnatal development of the GABA system in the rat spinal cord. *Japanese Journal of Pharmacology*. 1982; 32(1):1-7.
- ⁵³ Hedner T. et al. Central GABA mechanisms during postnatal development in the rat: neurochemical characteristics. *Journal Neural Transm*. 1984; 59(2):105-18.
- ⁵⁴ Brown M. et al. Changes in GABA-immunoreactivity during development of the rostral subdivision of the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience* 2000; 100(4):849-59.
- ⁵⁵ Cohen A.S. et al. Protracted postnatal development of inhibitory synaptic transmission in rat hippocampal area CA1 neurons. *Journal of Neurophysiol*. 2000; 84(5):2465-76.
-

- ⁵⁶ Luhmann HJ, Prince DA. Postnatal maturation of GABAergic system in rat neocortex. *Journal Neurophysiol.* 1991; 65(2):247-63.
- ⁵⁷ Illera M, Illera JC, Illera J. *El ratón y la rata*. Editorial Complutense. Madrid. 1991
- ⁵⁸ Majak K. et al. Parvalbumin immunoreactivity changes in the thalamic reticular nucleus during the maturation of the rat's brain. *Folia-Neuropathol.* 1998; 36(1): 7-14.
- ⁵⁹ Lagercrantz H. Classical and new neurotransmitters during development – some examples from control of respiration. *Journal of Developmental Physiology* 1984; 6: 195-205.
- ⁶⁰ Wong P.T. et al. Postnatal changes of GABAergic and glutamatergic parameters. *Brain-Res.* 1981; 227(4):519-29.
- ⁶¹ Vernadakis A, Woodbury DM. Electrolyte and amino acid changes in rat brain during maturation. *Am Journal Physiol.* 1962; 203: 748-752.
- ⁶² Cotman CW, editor. *Synaptic Plasticity*. New York: The Guilford Press; 1985.
- ⁶³ Florian CL, Williams SR, Bhakoo KK, Noble MD. Regional and developmental variations in metabolite concentration in the rat brain and eye: A study using ¹H-NMR spectroscopy and high performance liquid chromatography. *Neurochemical research.* 1996; 21(9): 1065-1074.
- ⁶⁴ Virgili et al. Regional maturation of the neurotransmitter-related and glial markers during postnatal development in the rat. *International Journal of Neuroscience.* 1990; 8(2): 159-66.
- ⁶⁵ Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben Ari Y. GABA: an excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends in neuroscien.* 1991; 14(12): 515-519.
- ⁶⁶ Gotz M, Bolz J. Differentiation of transmitter phenotypes in rat cerebral cortex. *Eur J Neurisci.* 1994; 6(1): 18-32.
- ⁶⁷ Bellion A, Metin C. Early regionlisation of the neocortex and the medial ganglionic eminence. *Brain Res Bull.* 2005 Sep; 66(4-6):402-9.
- ⁶⁸ Fitzgerald M, Koltzenburg M. The functional development of descending inhibitory pathway in the dorsolateral funiculus of the newborn rat spinal cord. *Dev. Brain Res.* 1986; 24: 261-270.
- ⁶⁹ Swanwick CC, Murthy NR, Mtchedlishvili Z, Seighart W, Kapur J. Development of gamma-aminobutyric acidergic synapses in cultured hippocampal neurons. *J comp. Neurol.* 2006 Apr; 495(5):497-510.
- ⁷⁰ Wonders C, Anderson SA. Cortical interneurons and their origins. *Neuroscientist.* 2005 Jun; 11(3):199-205.
- ⁷¹ Heck D, Sultan F. *El cerebelo*. *Investigacion y ciencia* 2002; 6-14.
- ⁷² Meinecke D.L. et al. Developmental expression of GABA and subunits of the GABA-A receptor complex in an inhibitory synaptic circuit in the rat cerebellum. *Brain-Res-Dev-Brain-Res.* 1990; 55(1):73-86.
- ⁷³ Butler AB, Hodos W. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Evolution and adaptation*. 1st ed. New York: Wiley-Liss Inc.; 1996.
- ⁷⁴ De-Biasi S. et al. Postnatal development of GABA-immunoreactive terminales in the reticular and ventrobasal nuclei of the rat thalamus: a light and electron microscopic study. *Neuroscience.* 1997; 76 (2) : 503-15.
- ⁷⁵ Amadeo A, de Biasi S, Frassoni C, Ortino B, Spreafico R. Immunocytochemical and Ultrastructural study of the rat perireticular Thalamic nucleus during postnatal development. *The Journal of comparative Neurology* 1998; 392: 390-401.

- ⁷⁶ Nicoletis MA. et all. Development of direct GABAergic projections from the zona incerta to the somatosensory cortex in the rat. *Neuroscience*. 1995; 65(2):609-31.
- ⁷⁷ Canepari M. et all. GABA and glutamate-mediated network activity in the hippocampus of neonatal and juveniles rats revealed by fast calcium imaging. *Cell-Calcium*. 2000; 7(1): 25-33.
- ⁷⁸ Seress L, Ribak CE. The development of GABAergic neurons in the rat hippocampal formation. An immunocytochemical study. *Developmental Brain Research*, 1988; 44: 197-209.
- ⁷⁹ Martina M. et all. Zinc modulation of bicuculline-sensitive and insensitive GABA receptors in the developing rat hippocampus. *Eur-Neuroscience*. 1996; 8(10): 2168-76.
- ⁸⁰ Kimura F, Baughman RW. GABAergic transcallosal neurons in developing rat neocortex. *The European Journal of neuroscience*. 1997; 9 (6): 1137-43.
- ⁸¹ Vincent SL. et all. Postnatal maturation of GABA-immunoreactive neurons of the rat medial prefrontal cortex. *Journal Comp-Neurol*. 1995; 355(1):81-92.
- ⁸² Ishikawa A, Shiono T, Tshiguro S, Tamai M. Postnatal developmental expresión of glutamine and related amino acids in the rat retina. *Current eye research*. 1996; 15(6):662-8.
- ⁸³ Fletcher EL, Kalloniatis M. Localization of amino acids neurotransmitters during postnatal development of the rat retina. *Journal of comparative neurology* 1997; 380(4): 449-71.
- ⁸⁴ Kosaka K et all. Postnatal development of neurons containing both catecholaminergic and GABAergic traits in the rat main olfactory bulb. *Bain-Res*. 1987; 403(2): 355-60.
- ⁸⁵ Kvale I. et all Development of neurotransmitter parametres in lateral geniculate body, superior colliculus and visual cortex of the albino rat. *Brain-Res*. 1983 ; 283(2-3) : 137-45.
- ⁸⁶ Merchan-Perez A. et all. Immunocytochemical detection of glutamate decarboxylase in the postnatal developing rat organ of Corti. *International Journal Dev. Neuroscience* 1990; 8(5) : 613-20.
- ⁸⁷ Zhang L, Chang YH, Feldman AN, Ma W, Lahjouji F, Barker JL, Hu Q, Maric D, Li BS, Li W, Rubinow DR. The expression of GABA(A) receptor alph2 subunit id upregulated by testosterone in rat cerebral cortex. *Neuroscience letters*. 1999; 265(1):25-8.
- ⁸⁸ Davis AM, Grattan DR, Selmanoff M, McCarthy MM. Sex differences in glutamic acid decarboxylase mRNA in neonatal rat brain: implications for sexual differentiation. *Hormones and behavior* 1996; 30(4):538-52.
- ⁸⁹ Reisert I, Lieb K, Beyer C, Pilgrim C. Sex differentiation of rat hippocampal GABAergic neurons. *European journal of neuroscience*. 1996;8(8): 1718-24.
- ⁹⁰ Lin Q, Wong-Riely MT. Postnatal developmental expresión of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats. *Journal Appl. Physiology*. 2005Apr; 98(4): 1442-57.
- ⁹¹ Meinecke DL, Rakic P. Developmental expresión of GABA and subunis of the GABA-A receptor complex in an inhibitory synaptic circuit in the rat cerebellum. *Developmental brain research* 1990; 55 (1): 73-86.
- ⁹² Merchan-Perez A. et all. Immunocytochemical detection of glutamate decarboxylase in the postnatal developing rat organ of Corti. *International Journal Dev-Neuroscience*.1990; 8(5) : 613-20.
- ⁹³ Katoh-Semba R. et all. Age-dependent and selective binding of beta-bungarotoxin to GABAergic neurons in the rat cerebellum. *Neuroscience Lett*. 1987; 76(1): 32 - 6.
- ⁹⁴ Cobas A. et all Transient GABA-like immunoreactive axons in the corpuscallosum of perinatal rats. *Neurosci-Lett*. 1988; 93(1):7-12.

-
- ⁹⁵ Greif KF. et all. Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum. *Neurochem-Res.* 199; 16(3): 235 - 42.
- ⁹⁶ Brickley SG et all Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA-A receptors. *Journal Physiol.* 1996; 497(3): 753-9.
- ⁹⁷ Ben-Ari Y. et all GABAergic mechanisms in the CA3 hippocampal region during early postnatal life. *Prog-Brain-Res.*1990; 83: 313-21.
- ⁹⁸ Sutor B, Luhman HJ. Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Perspect Dev Neurobiol.* 1995;2(4):409-19.
- ⁹⁹ Vincent SL. et all Postnatal maturation of GABA-immunoreactive neurons of the rat medial prefrontal cortex. *J-Comp-Neurol.* 1995; 355(1):81-92.
- ¹⁰⁰ Gomez-Lira G, Lamas M, Romo_parra H, Gutierrez. Programmed and induced phenotype of hippocampal granule cells. *Journal neuroscience.* 2005 Jul; 25(30):6939-46.
- ¹⁰¹ Merchan-Perez A. et all Immunocytochemical detection of glutamate decarboxylase in the postnatal developing rat organ of Corti. *Int-J-Dev-Neuroscience.*1990; 8(5) : 613-20.
- ¹⁰² Davis AM, Grattan DR, McCarthy MM. Decreasing GAD neonatally attenuates steroid-induced sexual differentiation of the rat brain. *Behavioral neuroscience.* 2000; 114(5):923-33.
- ¹⁰³ Leret ML, Peinado V, Suarez LM, Tecedor L, Gamallo A, Gonzalez JC. Role of maternal adrenal glands on the developing serotonergic and aminocidergic systems of the postnatal rat brain. *International Journal of developmental neuroscience* 2004; 22 : 87-93.
- ¹⁰⁴ Merchan-Perez A. et all. Ontogeny of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid immunoreactivities in the rat cochlea. *Eur-Arch-Otorhinolaryngol.*1990; 248 (1): 4-7.
- ¹⁰⁵ Merchan-Perez A, Gil-Loyzaga P, Lopez-Sanchez J, Eybalin M, Valderrama FJ. Ontogeny of gamma-aminobutiric acid in efferent fibers to the rat cochlea. *Developmental brain research.* 1993; 76(1): 33-41.
- ¹⁰⁶ Heinamaki AA, Lindfords AS. Free aminoacids in rat ocular tissues during postnatal development. *Biochemistry international* 1988; 16(3):405
- ¹⁰⁷ Versaux-Botteri C. et all. Immunohistochemical localization of GABA-containing neurons during postnatal development of the rat retina. *Invest-Ophthalmol-Vis-Sci.* 1989; 30(4) : 652-9
- ¹⁰⁸ Sakatani K. et all. Transient presence and functional interaction of endogenous GABA and GABA-A receptors in developing rat optic nerve. *Proc-R-Soc-Lond-B-Biol-Sci.*1992; 247 (1319): 155-61.

IV. DISCUSIÓN

Una vez analizados los resultados podemos concluir que existen dos tipos de datos, unos anatómicos y otros funcionales, que podemos resumir:

Datos anatómicos que se desprenden del análisis de los mapas de resultados:

1. Existe un gradiente caudo-cefálico de aparición del GABA a lo largo del desarrollo embrionario de la rata.
2. La formación del GABA no está restringida a ciertos núcleos anatómicamente determinados, como pueda ser el caso de otros neurotransmisores, sino que lo hace como una red extensa y difusa que cubre todos los niveles cerebrales estudiados.
3. Existe un periodo de maduración postnatal para lograr los niveles del adulto.

Datos funcionales que se desprenden de la revisión de artículos sobre el cambio de la naturaleza del GABA:

4. En los periodos embrionario y postnatal temprano, el GABA actúa como neurotransmisor despolarizante de la membrana postsináptica.
5. De nuevo podemos identificar un gradiente de maduración funcional caudo-cefálico donde el GABA pasa de actuar como despolarizante a hiperpolarizante de la membrana postsináptica.
6. Cuando se alcanza la edad adulta el GABA esta plenamente maduro tanto a nivel anatómico como a nivel funcional, convirtiéndose en el neurotransmisor inhibitor mas importante del SNC de vertebrados.

Nos encontramos de nuevo con la premisa básica del campo de la neurociencia, que nos lleva a estudiar la estructura y función simultáneamente. A lo largo de esta discusión vamos a analizar cada uno de los puntos anteriores para explorar cual puede ser el significado biológico de estos resultados.

4.1. Existe un gradiente caudo-cefálico de aparición del GABA a lo largo del desarrollo embrionario de la rata.

El análisis de los esquemas presentados en el capítulo anterior nos hacen concluir que la aparición del GABA, desde el momento que se detecta en ED-11, sigue un patrón de maduración caudo-cefálico concordante con los patrones de desarrollo embrionario del SNC. La aparición del GABA comienza en la médula espinal, continúa por el tronco del encéfalo, el cerebelo y progresa hacia niveles corticales. Desde el momento inicial en el cual se detecta el GABA en SNC, este va ir apareciendo en todas las estructuras embrionarias nuevas que se van desarrollando. La razón por la cual hemos incluido un apéndice en la introducción, sobre el desarrollo embrionario del sistema nervioso central de la rata, ha sido permitir al lector una guía para el estudio comparado de los días embrionarios en los cuales aparecen las estructuras cerebrales con los días en los que aparece el GABA en cada una de dichas estructuras.

Aún así merece una mención especial la aparición transitoria de niveles de GABA superiores a los del adulto en algunas áreas cerebrales estudiadas. Tal y como veíamos en las graficas presentadas en el capítulo anterior. Podemos apreciarlo claramente en el tronco del encéfalo en el grafico 31, en el bulbo olfativo en el grafico 33, en el cortex cerebral grafico 34 y en el nervio óptico en el grafico 36.

Proponemos que este aumento transitorio de la concentración de GABA pueda ser debido a la función que desempeña el GABA como promotor de la sinaptogénesis, en áreas de crecimiento. Aunque también sería posible que el aumento temporal del GABA, en ciertas áreas, ejerciera un papel protector, en el periodo de transición entre la función despolarizante y la función inhibitoria. En todo caso, como hemos visto en la introducción, el GABA presenta algunas otras funciones que aún debe ser exploradas con mayor profundidad.

4.2. La formación del GABA no está restringida a ciertos núcleos anatómicamente determinados, sino que lo hace como una red extensa y difusa que cubre todos los niveles cerebrales estudiados.

Como hemos podido comprobar la presencia del GABA no se restringe a ciertos núcleos, sino que aparece como una red difusa presente en todos los niveles cerebrales que se han estudiado. No es este el caso de otros neurotransmisores, como la dopamina de la sustancia nigra, la serotonina del núcleo del raphe o la noradrenalina del núcleo ceruleus, cuya producción se restringe a un área tronco-encefálica proyectando a otras zonas más o menos cercanas, donde pueden aparecer o ser detectadas¹²⁷.

¿Por qué la inhibición se monta en todos los circuitos cerebrales que hemos estudiado? Como hemos puesto de manifiesto en la introducción, el GABA es el neurotransmisor inhibitor más importante del cerebro de mamíferos y los sistemas neurales han evolucionado hacia un mayor número de ínter-neuronas. Este aumento de ínter-neuronas parece que permite un mejor procesamiento tanto en lineal como en paralelo de la información de entrada y una mejor regulación de la respuesta motora de salida, estas ínter-neuronas son neuronas GABAérgicas, en su mayoría, como veíamos anteriormente. Este proceso se observa a todos los niveles cerebrales, medulares, del tronco del encéfalo, mesencefálicos y diencefálicos, pero es a nivel cortical donde adquiere toda su relevancia.

Parece que la evolución del sistema nervioso central a lo largo de la escala filogenética y muy especialmente en los mamíferos, con un índice de encefalización creciente, esta basado en un aumento del número de neuronas tanto de naturaleza excitadora como de naturaleza inhibitora. Pero muy especialmente hay un aumento de ínter-neuronas en todos los circuitos cerebrales que permiten el refinamiento del procesamiento de la señal de entrada eferente, así como del refinamiento de la respuesta motora eferente.

Lo cual les daría una ventaja adaptativa.

Pero también podríamos pensar que el aumento de funciones motoras del cortex cerebral ha ido aumentando tanto en cantidad como en sofisticación, -en el caso de los humanos la bipedestación y la marcha, el lenguaje la función manual con la escritura-, todos estos sistemas eferentes son dependientes de

la salida de la poderosas neuronas piramidales motoras de la capa V, todas ellas glutaminérgicas. Un minucioso control del sistema excitador debe ser fundamental ya que la excito-toxicidad del glutámico podría llegar a “quemar” el sistema.

Observemos la naturaleza de la función de los neurotransmisores que encontramos en los núcleos mesencefálicos como la serotonina -en los núcleos del rafe-, frente a la función que presentan los neurotransmisores como el ac. Glutámico en la excitación y el GABA en la inhibición a nivel cortical. Creemos que comparativamente esta diferencia funcional puede tener su correlato con una distribución anatómica mas difusa y dispersa.

4.3. Existe un periodo de maduración postnatal para lograr los niveles del adulto.

La existencia de un periodo de maduración postnatal es patrimonio de los mamíferos, con la aparición de la corteza cerebral a nivel evolutivo. La rata nace después de 22 días de gestación, siendo un animal de crecimiento rápido, motivo por el cual es candidato preferente para muchos de los estudios realizados en laboratorio. El animal alcanza el peso del adulto en dos semanas, siguiendo con la nomenclatura del capítulo anterior, en PND-14. Así mismo, la edad del destete corresponde a PND-21; se llega a la pubertad a las 8-12 semanas de vida, y la edad reproductiva se sitúa entre las 10 y 12 semanas de vida¹.

El periodo de maduración postnatal es un periodo altamente intrigante. ¿Por qué existe?, ¿Para qué sirve? ¿Qué sentido tiene que la madre naturaleza mande a sus criaturas al mundo sin tener dispuestas todas sus herramientas, en este caso neurológicas, para hacer frente a las eventualidades? ¿Por qué en mamíferos este periodo es especialmente largo?

El periodo de maduración postnatal corresponde a un periodo de la vida del individuo en la cual ya existe interacción entre el entorno y el sistema nervioso, participando el aprendizaje y la experiencia en el moldeado de los circuitos

cerebrales^{2,3}. Parecería que la entrada sensorial y la salida motora estarían implicadas en la activación de los sistemas ya que el refinamiento de las sinapsis dependientes de función sería un paso crucial para formación precisa de circuitos excitadores o inhibidores⁴.

Varios autores proponen la importancia de la función neural en el refinamiento de los circuitos cerebrales. Walmsley et al⁵, proponen que *“la actividad neural juega un importante papel en la regulación de la fuerza o peso sináptico así como en las propiedades de la membrana de la neurona”*.

Este periodo de la vida del animal- el periodo postnatal- es precisamente en el cual se realiza el cambio de naturaleza del neurotransmisor GABAérgico de despolarizante a hiperpolarizante.

4.4. En los periodos embrionario y postnatal temprano, el GABA actúa como neurotransmisor despolarizante de la membrana postsináptica.

En 1973, Osuka⁶ propuso en un artículo que presentó en un congreso, que *“el GABA cumple todos los criterios establecidos hasta la fecha, para ser una molécula transmisora en SNC”*. Desde ese momento se le ha considerado el neurotransmisor inhibitor más importante y abundante del cerebro de mamíferos.

Los trabajos realizados por varios laboratorios a lo largo de los años ochenta, comenzaban a poner de manifiesto que en ciertos momentos del desarrollo el GABA inducía despolarización en la membrana postsináptica en vez de la esperada hiperpolarización, y que a lo largo del desarrollo se producía un cambio de función^{7,8}. Este dato inicialmente produjo cierto desconcierto en la comunidad científica, pero el número de trabajos aumentaba y parecía que se confirmaba en cada nueva publicación.

Finalmente el grupo de Cherubini et al⁹, en 1991 publicaron un artículo donde afirmaban que *“el GABA es un neurotransmisor excitador en el periodo*

postnatal temprano”. A partir de ahí, numerosos autores comienzan a explorar este nuevo enfoque, aparecieron artículos de diferentes áreas cerebrales, así como de diversos momentos del desarrollo y sus características^{10, 11}.

El trabajo de Cherubini et al⁹ se realizó con animales en la primera semana de vida postnatal, en neuronas del hipocampo, y deja establecidas las líneas básicas:

- *Los receptores GABA-A median la “excitación” en neuronas neonatales.*
- *Este efecto es debido a los diferentes gradientes de Cloro.*
- *Existen cambios en la estructura del receptor GABA-A a lo largo del desarrollo.*
- *Los receptores GABA-A aportan las descargas tónicas excitadoras necesarias para el crecimiento y la diferenciación.*
- *Solo con la llegada de las corrientes de glutámico y otras provocadas por otros neurotransmisores excitadores cambia el gradiente del Cloro y entonces el GABA ejerce su papel de neurotransmisor inhibitor en el adulto.*

4.4.1. ¿Qué sentido biológico puede tener el hecho de que el NT inhibitor más importante actúe como despolarizante durante el desarrollo embrionario y las primeras etapas de desarrollo postnatal? El aprendizaje biológico.

En 1949 Donald Hebb¹², publicó su libro “The Organization of Behaviour” donde enunció una de las hipótesis, actualmente mas aceptada, sobre el aprendizaje, conocida como la regla de Hebb: “*neuronas que disparan juntas se conectan juntas*”. Hebb fué pionero en la idea de que la co-activación fortalece las conexiones sinápticas entre las células y lleva a grupos de neuronas espacialmente relacionados a formar ensamblajes celulares y finalmente circuitos funcionales¹³. Hicieron falta unos cuantos años hasta que llegamos a conocer los mecanismos bioquímicos y a nivel molecular que subyacían a esta afirmación. En 1973 se describió la “Potenciación a largo plazo” – LTP, en sus

iniciales en inglés-. La LTP ha sido usada por numerosos autores como soporte a la regla de Hebb y ha ido ganando favor en los diversos modelos de aprendizaje. Según los principios de potenciación a largo plazo, para que una sinapsis se consolide tiene que disparar un determinado número de veces, en un determinado periodo de tiempo. El mecanismo molecular presente en la LTP ha sido muy estudiado en diversas áreas del cerebro, pero especialmente en el hipocampo e implica a los receptores de glutámico así como la entrada de Ca^{+2} dentro de la célula¹⁴.

Durante la estimulación de baja frecuencia el neurotransmisor ácido glutámico se une a los receptores postsinápticos denominados AMPA -kainato-quisqualato-A¹⁴- los cuales se abren, así mismo se une a los receptores NMDA pero estos no se abren ya que se encuentran bloqueados por la presencia de un ión Magnesio. Sin embargo durante la estimulación de alta frecuencia se abren ambos canales ya que el Magnesio se desbloquea, permitiendo al Calcio entrar en la célula. El calcio entrante genera un mensaje retrogrado en la célula presináptica que había sido activada anteriormente. Este mensaje produce cambios adaptativos en la terminal postsináptica que permite que mas ácido glutámico sea liberado, cuando sea estimulado de nuevo. Este proceso nos permite entender la forma en la cual las conexiones sinápticas entre 2 neuronas son mas eficaces cuando ambas células han estado por encima del umbral y disparan al mismo tiempo. Resumiendo las leyes de Hebb se podrían enunciar:

- Las conexiones entre las neuronas se fortalecen si la neurona pre y post sináptica disparan juntas o correlacionadas en el tiempo.
- Las conexiones entre neuronas se debilitan si la neurona pre y post sináptica no disparan correlacionadas en el tiempo.

¿Cómo es posible que ocurra esto en un circuito de inhibición? Hemos de tener en cuenta que la regla de Hebb implica la coincidencia espacio-temporal¹⁵, es decir la coincidencia de la actividad de la célula presináptica y la actividad de la célula postsináptica, que permita los cambios en las proteínas kinasas,

fosfatasa y en los niveles de Ca^{+2} intracelular, sin los cuales no se producirían las modificaciones moleculares subyacentes a la LTP¹⁶. Este modelo de trabajo presentaba un problema a la hora de explicar el funcionamiento de las células inhibitorias, las cuales quedaban excluidas, aludiendo, los diversos autores a mecanismos de aprendizaje no-hebbianos, para el sistema inhibitorio¹⁷. Exponemos a continuación una tabla basada en 1-respuesta y 0-ausencia de respuesta o de disparo que nos permita visualizar mejor lo que estamos proponiendo. Hemos de tener en cuenta que lo que consigue la función inhibitoria es impedir el disparo de la neurona postsináptica, provocando una hiperpolarización de la membrana que le hace menos susceptible de disparar.

Célula presináptica	Tipo de respuesta Potencial de acción	Célula postsináptica	Tipo de respuesta Potencial de acción
Excitadora	1	Excitadora	1
Excitadora	1	Inhibidora	0
Inhibidora	1	Excitadora	0
Inhibidora	1	Inhibidora	0

Figura 4.1.

Si observamos lo que ocurre en el proceso de la inhibición, contrariamente a lo que ocurre en la excitación, el disparo de una sinapsis inhibitoria está necesariamente no-correlacionado con el disparo de la postsináptica a la cual se supone que debe inhibir, por lo tanto parece imposible que los circuitos inhibitorios se puedan refinar a través del fortalecimiento de las sinapsis. La situación que se encuentra en el animal adulto es incompatible con las reglas de Potenciación a largo plazo y la regla de aprendizaje de Hebb. Tendríamos que asumir por tanto que los circuitos cerebrales que integran la inhibición no se forman siguiendo los mecanismos conocidos hasta ahora, o tal vez vengan determinados genéticamente. Es decir la inhibición en SNC seguiría leyes desconocidas por el mundo científico hasta ahora. Además, la idea de refinar

los circuitos inhibitorios a través de la plasticidad dependiente de la función presenta las mismas dificultades de tipo conceptual.

Salvo que durante un periodo determinado de tiempo las sinapsis “inhibitorias” fueran temporalmente “excitadoras”....

podría ser una explicación plausible que los circuitos GABAérgicos quedaran establecidos en un periodo de transición, con potenciales de acción despolarizantes, que logran conectar neuronas formando circuitos inhibitorios, que fueran plenamente funcionales al llegar a la edad adulta.

Se ha observado en el trabajo realizado en un circuito inhibitorio de la ruta auditiva, en la Oliva superior lateral (LSO)¹⁸ que *“el refinamiento del circuito tanto a través de la eliminación de ciertas sinapsis como por el fortalecimiento de otras sigue el mismo patrón que las sinapsis excitadoras”*. Este proceso tiene lugar en una ventana temporal que va desde PND-1 hasta PND-11/14. Durante este proceso unas sinapsis se podan y eliminan y otras se fortalecen, de forma que al final quedan las mas eficaces, refinando el futuro circuito inhibitorio¹⁹. Hemos de hacer notar que este proceso tiene lugar precisamente antes de que empiece la función auditiva que tiene lugar aproximadamente en PND-14.

Efectivamente durante este periodo de tiempo las sinapsis GABAérgicas son despolarizantes: En el LSO en PND-1 el ECI- es de -48 mV y cuando empieza la audición ya ha pasado a ser ECI- de -82 mV¹⁸.

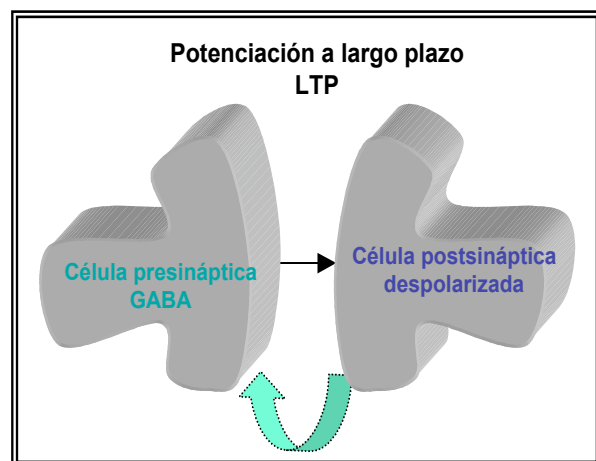


Figura 4.2.

Durante el periodo de refinamiento las entradas de GABA despolarizan la neurona postsináptica, lo cual provoca un incremento de $[Ca^{+2}]$ intracelular en

esta célula postsináptica y se puede producir un potencial de acción. En sinapsis inhibitorias se da una correspondencia temporal entre el refinamiento de los circuitos para el desarrollo de la inhibición y las propiedades despolarizantes del GABA, para culminar unos pocos días antes de entrar en funcionamiento los circuitos para la audición. Este mecanismo de plasticidad sináptica se pierde posteriormente, pero deja un mapa inhibitorio auditivo ipsilateral bien ordenado ¹⁹.

Por lo tanto durante el desarrollo la situación podría ser la siguiente: El GABA actúa despolarizando la neurona postsináptica.

Estas dos células al disparar juntas durante un cierto tiempo, se conectan juntas, formando un circuito neural que *“ya han aprendido”*. Con el tiempo y según un posible programa de activación génica se modificara la expresión de las proteínas del receptor postsináptico del GABA así como de los extrusores de Cl⁻, pasando a ser una sinapsis inhibitoria, pero para ese momento el circuito que integra la excitación y la inhibición ya estará formado.

Como propone Ben Ari²⁰, *“parece que la naturaleza ha encontrado una elegante manera de solucionar varias cuestiones”. Este mecanismo permite “excitar” neuronas en desarrollo para promover la formación de circuitos y el crecimiento sináptico, evitando efectos potencialmente tóxicos de un desencuentro entre una excitación muy potente y una inhibición no completamente estructurada. El elemento clave de esta cascada está en la función del GABA, que añade un elemento clave a la construcción de los circuitos cerebrales.*

4.4.2. Papel del receptor GABA-A en el cambio de función

El cambio de papel del GABA de neurotransmisor excitador que genera despolarización en la neurona postsináptica durante la embriogénesis y el desarrollo postnatal, al papel de inhibidor o hiperpolarizante de la neurona postsináptica en cerebro de adulto, no parece estar ligado a la neurona

presináptica o liberadora de la molécula de GABA per se, sino a la respuesta de la neurona postsináptica. Y más específicamente al papel del receptor GABA-A y al potencial de reversión del Cloro, como propusieron en su trabajo inicial Cherubini et al⁹.

Hablar de receptores de GABA-A es hablar del componente postsináptico de la sinapsis GABAérgica, que puede ser tanto una neurona liberadora de cualquier otro neurotransmisor como de otra neurona liberadora a su vez de GABA.

Como veíamos en la introducción cuando describíamos la estructura del receptor GABA-A, existe una gran familia génica que codifica para las diferentes subunidades. Lo cual pone de manifiesto el alto número de posibles combinaciones de expresión, teniendo en cuenta todas las variables:

- diferentes sub-unidades estructurales
- diversas localizaciones en SNC
- variabilidad temporal: periodos embrionario, neonatal, postnatal y adulto.

En el momento actual se piensa que la expresión de las diferentes sub-unidades de la molécula receptora, marcan diferentes momentos madurativos:

Periodo embrionario: La expresión del receptor GABA-A es muy temprana en el desarrollo embrionario, detectándose en ED-14 en el primodio cortical, aunque de una forma todavía difusa, su presencia va aumentando paulatinamente hasta llegar en ED-20 a estar presente en todo el estrato cortical²¹. Su patrón de desarrollo sigue un gradiente de dentro a fuera. De hecho se piensa que la expresión del receptor GABA-A en el cerebro de rata en desarrollo, ocurre simultáneamente a la maduración dendrítica de las células GABA-inmunopositivas²¹.

La expresión de los genes de las 19 sub-unidades del receptor GABA-A²², se puede estudiar por hibridación in-situ, observándose que cada transcrito presenta un perfil único de expresión espacio-temporal en el cerebro de rata. Estos cambios en la expresión temporal de las diferentes sub-unidades se observa a lo largo de todo el desarrollo, en el periodo embrionario, postnatal y finalmente en el animal adulto^{23, 24}. Los cambios en la expresión génica de las

sub-unidades del receptor GABA-A sugieren una explicación molecular para las observaciones señaladas anteriormente sobre el cambio de afinidad del ligando y el cambio de función del GABA²³.

Por ejemplo en corteza y tálamo es muy pronunciada la expresión de los genes de las sub-unidades $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, y $\beta 3$, durante el periodo de desarrollo, pero la expresión cortical y en tálamo de estos cuatro genes, disminuye a lo largo del tiempo y es sustituida en el animal adulto por la presencia de $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y δ ²³.

Específicamente en corteza cerebral, se ha observado durante el desarrollo embrionario, varios patrones de expresión, en relación a las diferentes sub-unidades²⁵:

- $\alpha 1$: Esta sub-unidad no se expresa durante el periodo embrionario, y como veremos mas adelante comienza a expresarse cuando la función del GABA empieza a establecerse como neurotransmisor inhibitor en el cerebro de adulto^{25, 35}.
- $\alpha 4 - \beta 1$: Estas sub-unidades se expresan durante el desarrollo embrionario en el neuroepitelio indiferenciado y en las capas corticales en desarrollo. Por ello parece que estarían implicadas en la diferenciación del neuroepitelio y el desarrollo del estrato cortical²⁵.
- $\alpha 3 - \beta 2 - \beta 3 - \gamma 4$: Estas sub-unidades se encuentran en el desarrollo embrionario en las capas corticales en desarrollo, lo cual hace pensar que están implicadas en el desarrollo del estrato cortical²⁵.

Si revisamos los datos disponibles, encontramos:

ED-13: Se produce la expresión de los mRNAs que codifican para las sub-unidades del receptor GABA-A ($\alpha 1-6$, $\beta 1-3$, $\gamma 1-3$, y δ), las conocidas hasta la fecha, se estudiaron en la medula espinal de rata y en el ganglio de la raíz dorsal, detectándose en ED-13, todas las sub-unidades excepto $\alpha 6$. Se podían distinguir dos grupos anatómicos: uno en la zona ventricular y otro en la capa

del manto. Algunos de estos transcritos desaparecen en ED-17 siendo su expresión transitoria, mientras que otros se mantienen hasta la edad adulta²⁶.

En otros estudios de células de la región dorsal de la medula espinal de rata en ED-13 muestran transcritos de tres sub-unidades α 4, β 1 y γ 1 por hibridación in-situ, pero por inmunocitoquímica se detectan además otras sub-unidades como α 2, α 3, β 3 y γ 2²⁷.

ED-15: Se detectan por primera vez mRNAs de las sub-unidades β 2, β 3 y γ 2 en medula espinal de rata, siguiendo un gradiente ventral-dorsal y en las regiones inferiores como el puente, la medula y el tálamo²⁸. En la zona del manto de la región ventral de la zona cervical de la medula espinal se detectan α 2, α 3, α 5, β 2, β 3 y γ 2²⁷.

Progresando hacia zonas más cefálicas, en el bulbo olfatorio de rata de ED-15 se detectan los transcritos que codifican para las sub-unidades α 2, β 2 y β 3²⁹. El mRNA de la sub-unidad β 3 concretamente, se encontró que se expresa abundantemente en las células del bulbo olfatorio²⁸.

La expresión de estos transcritos en cerebro embrionario completo de rata en ED-15 son las sub-unidades α 2 y α 3³⁰.

Con otras técnicas – extracción de mRNA, inyección en oocitos, expresión del receptor y medida de las corrientes generadas por antagonistas, aparecen en ED-15 aumentando progresivamente hasta llegar al máximo en PND-30³¹.

ED-16 : Por técnicas de hibridación in-situ practicadas con todas las sub-unidades del receptor GABA-A, en neocortex de rata extraído de embriones de ED-16, se han detectado β 2 y γ 2³². Así mismo en células también del neocortex de rata en ED-16 que posteriormente son cultivadas, se han medido corrientes postsinápticas mediadas por el receptor GABA-A³³.

ED-17: En células extraídas de todo el cerebro de rata embrionaria en ED-17 se detecta la expresión de las sub-unidades $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 5$, estas subunidades están presentes de forma abundante en numerosas áreas del SNC. La subunidad $\alpha 6$ está presente pero en menor cantidad en el neuroepitelio cortical y su presencia va ir disminuyendo paulatinamente hasta que en ED-19 ya no se detecta²⁸.

En ED-17 en la zona cefálica del SNC las sub-unidades $\beta 2$, $\beta 3$ y $\gamma 2$, se detectan por primera vez en la capa externa del hipocampo y en todo el neuroepitelio cortical²⁸.

ED-18: En ED-18 se detecta, por primera vez en neocortex de rata, el mRNA de la sub-unidad $\alpha 1$ ³². En ED-18 se observa en neuronas de neocortex, la aparición de las primeras corrientes postsinápticas mediadas por el receptor GABA-A, siendo estas corrientes de naturaleza despolarizante³⁴.

ED-19: Según algunos autores la aparición del mRNA de $\alpha 1$ se retrasaría un día, detectándose por primera vez en el cortex de rata en ED-19³⁰. En ED-19 los mRNAs mensajeros de las sub-unidades $\beta 2$, $\beta 3$ y $\gamma 2$ se reparten de forma abundante por todo el SNC, co-existiendo en todas las áreas estudiadas a excepción del giro dentado y de la corteza entorrinal; en estas áreas si se expresaran conjuntamente pero en el animal adulto²⁸. En zonas como el bulbo olfatorio en desarrollo, las células glomerulares expresan unas subunidades frente a las células mitrales que expresan otras²⁸.

Nacimiento y Periodo Postnatal: En estudios globales de todo el SNC, se detecta que la inmunoreactividad de la sub-unidad $\alpha 1$ es muy baja en el momento del nacimiento y restringida a unas pocas áreas cerebrales y se incrementa mucho durante las primeras semanas de vida postnatal³⁵. La inmunoreactividad de la sub-unidad $\alpha 2$, muestra una distribución muy amplia al nacimiento y desaparece de muchas áreas justo después de que aparezca la sub-unidad $\alpha 1$, dándose un periodo de co-existencia de ambas³⁵. La otra

subunidad $\alpha 3$, se presenta en niveles muy altos al nacimiento para ir disminuyendo su presencia con la edad³⁶. En el caso de las sub-unidades $\beta 2$ y $\beta 3$ su marcaje es abundante y amplio en todos los estadios indicando que estas sub-unidades están presentes en los receptores tanto de neonatos como de adultos³⁵. La combinación mas abundante en animales neonatos es $\alpha 2$, $\beta 2$ y $\beta 3$ ³⁵.

En medula oblongata ya presenta el mismo número de lugares de unión de GABA que en el adulto, por el contrario en cerebelo y en corteza frontal, el numero de lugares de unión va aumentando de forma lineal³⁷.

En tronco del encéfalo por técnicas de auto-radiografía, se detecta la presencia de receptores GABA-A en todas las zonas estudiadas, pero si comparamos la densidad de marcaje entre zonas caudales y rostrales, vemos que la densidad es mayor en las zonas del tronco del encéfalo que en las zonas rostrales donde se alcanzara un pico de densidad mas adelante, entre PND-5 Y PND-10³⁸. Se observa que en zonas como el cerebelo, la corteza, el tálamo y el giro dentado la densidad de marcaje va a ir aumentando con la edad, especialmente entre PND-10 y PND-21³⁸, mientras que estructuras anteriores como el caudado-putamen y el área CA1 del hipocampo no aumentan de forma notable después del nacimiento³⁸. Estos datos nos sugirieron que los receptores GABA-A se desarrollan antes en estructuras filogeneticamente mas antiguas que en regiones mas nuevas.

Las células de Purkinje del cerebelo no presentan sin embargo ningún cambio a lo largo del desarrollo expresando desde el nacimiento hasta la edad adulta la misma combinación de subunidades, es decir $\alpha 1$, $\beta 2$, $\beta 3$ y γ ²³.

El estudio del hipocampo de rata neonatal pone de manifiesto que ya se están expresando sub-unidades, siendo la mas abundante $\alpha 5$, seguida de $\gamma 2$, $\alpha 2$ y $\alpha 4$ respectivamente; las otras sub-unidades se expresan también, pero en

cantidades mucho menores, observándose una pequeña presencia de la sub-unidad δ ³⁹.

Todas las sub-unidades estudiadas en el neocortex de rata muestran un nivel máximo de expresión en el nacimiento por comparación con otras áreas y van a seguir aumentando sus niveles hasta llegar a PND-15³². Además al nacimiento, en neocortex de rata se detecta actividad eléctrica despolarizante en el 50% de las neuronas, mediada por los receptores de GABA-A³⁴.

A lo largo de los siguientes días postnatales, podemos detectar pequeños cambios paulatinos en la composición de las sub-unidades del receptor GABA-A, que exponemos a continuación:

PND-2: Como veíamos anteriormente, en células granulares de cerebelo extraídas de sujetos de PND-2/10 se detecta la presencia de las sub-unidades $\alpha 1$ y $\alpha 6$, mostrando un perfil que se correlaciona con la madurez del cerebelo en este estadio⁴⁰.

PND-5: En este momento se detecta por primera vez el mRNA de $\alpha 1$ en hipocampo³⁰. En PND-5 se siguen expresando $\beta 2$, $\beta 3$ y $\gamma 2$ conjuntamente y han aparecido las sub-unidades $\beta 1$ y δ en el hipocampo y en la corteza entorrinal²⁸.

PND-7: De las posibles 19 sub-unidades conocidas hasta la fecha de este trabajo, las células granulares del cerebelo presentan un grupo específico de subunidades que forman el receptor GABA-A para el GABA, formado por $\alpha 1$, $\alpha 6$, $\beta 2$, $\gamma 2$ y δ ²². Y según las respuestas EC50 al GABA se pueden clasificar en tres grupos, siendo el primero el que aparece entre PND-7 y PND-14, cuando comienza a expresarse la sub-unidad $\alpha 6$. El segundo grupo estaría presente entre PND-15 y PND-28, donde parece que hay un 50% de células que expresan ya $\alpha 1$ y $\alpha 6$, y finalmente otro activo desde PND-28 hasta edades adultas²². La expresión madura de la sub-unidad $\alpha 6$ del receptor GABA-A se encuentra en las células granulares de cerebelo desde PND-7, es decir el mensajero tal y como se encuentra en adultos -anteriormente entre ED-15 y animales neonatos y en la primera semana de vida, se encontraba como un

pre-mensajero-, ha ido aumentando hasta llegar a un pico en PND-21, este mensajero se mantiene a partir de ese momento a niveles constantes⁴¹. Sin embargo la sub-unidad $\alpha 1$, en células granulares de cerebelo, sufre un descenso drástico entre PND-21 y PND-28⁴¹.

Varios autores han propuesto la hipótesis de que la aparición de la sub-unidad $\alpha 1$ en el cerebro de rata, a lo largo del desarrollo podría estar implicado o marcar el inicio, en el cambio de función del GABA. Inicialmente el GABA tendría una función que le implicaría en la diferenciación neuronal, con un importante papel en la despolarización postsináptica. Posteriormente asumiría su papel clásico como neurotransmisor inhibitor en el cerebro de adulto³⁵. Los estudios de desarrollo muestran que el incremento de los niveles de mRNA de la sub-unidad $\alpha 1$, del receptor GABA-A, en distintas áreas del cerebro de rata aumentan entre PND-7 y PND-21 de manera similar al desarrollo de los lugares de unión de las benzodiazepinas⁴². Las zonas mas rostrales del SNC llegan a un pico en la expresión del receptor GABA-A entre PND-5 y PND-10³⁸.

Si analizamos la expresión de las otras sub-unidades, como son las β - $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ - observamos varios patrones de expresión⁴³:

- $\beta 3$ sigue un patrón de expresión donde en el nacimiento su expresión es muy alta y continua a lo largo del periodo postnatal, en áreas como el isocortex, el bulbo olfatorio, la formación hipocámpica, la amígdala, el septum, la cama de la estria terminalis, el caudado-putamen, el núcleo acumbens, el globo pálido, el pálido ventral y el hipotálamo⁴³.
- Las subunidades $\beta 1$ y $\beta 2$ siguen un patrón diferente donde hay muy poca o nula expresión en el momento del nacimiento con un rápido aumento hasta alcanzar el nivel del adulto en la etapa temprana postnatal, en las áreas estudiadas: isocortex, formación hipocámpica, etc⁴³.

- Existe un tercer tipo de patrón, ligado la expresión transitoria y escasa de $\beta 1$, en núcleo olfatorio anterior, en el tubérculo olfatorio, así como en la corteza piriforme. En el momento del nacimiento $\beta 1$ esta presente en estas áreas, aumenta hasta lograr un pico en la etapa postnatal para desaparecer luego en la vida adulta⁴³.

En el núcleo reticular del tálamo -NRT- estructura que esta formada en su totalidad por neuronas GABAérgicas, también se expresan receptores GABA-A postnatalmente, pero la potencia del GABA activando estos receptores decrece a lo largo de la vida postnatal, hasta llegar al individuo adulto; esta bajada de función parece que es suplida simultáneamente por un aumento de la densidad de los receptores en las membranas celulares postsinápticas⁴⁴.

PND-30: Este estudio se realiza en hembras y se observa que el GABA y su sistema de receptores GABAérgicos GABA-A y GABA-B ejerce un papel claramente inhibitorio sobre el eje hipotalámico-pituitario-ovárico, así como sobre la liberación de Glutámico y taurina, durante el proceso puberal⁴⁵.

Animal adulto: En el animal adulto la combinación más abundante de sub-unidades del receptor GABA-A, que se detecta por inmunocitoquímica, es $\alpha 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ ³⁵. Pero si analizamos específicamente la corteza cerebral del animal adulto, encontramos la composición del receptor como $\alpha 1$, $\beta 2$, $\gamma 2$. En un análisis de la distribución de estas tres sub-unidades en las distintas capas de la corteza, observamos una mayor expresión en la capa IV, en zonas granulares, y en las capas III y V superior, en zonas agranulares. Este patrón de organización regional diferencial del receptor GABA-A parece que podría estar relacionado con el crecimiento y organización de las proyecciones tálamo-corticales, y en la maduración de los propios circuitos corticales³². Ya que la expresión de los cuatro genes presentes en el desarrollo embrionario, en las proyecciones talamo-corticales disminuye y es sustituida en el animal adulto por $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\beta 2$ y δ ²³.

El cerebelo ha sido otro de los lugares de abundante estudio de la familia génica del receptor del GABA-A, tanto por los patrones de desarrollo conocidos, como por la presencia de muchas de las sub-unidades del receptor GABA-A⁴⁶. Si realizamos un cuadro sinóptico, podemos observar la presencia de las diferentes sub-unidades en los diferentes tipos celulares:

GABA-A	CAPA MOLECULAR	CAPA DE CÉLULAS DE PURKINJE	CAPA GRANULAR	NÚCLEOS CEREBELOSOS
$\alpha 1$	+	++	+	++
$\alpha 3$	++	-	-	++
$\alpha 4$	++	-	-	+
$\beta 1$	+	++	+	-
$\beta 2$	+	++	++	++
$\beta 3$	++	-	++	+
$\gamma 1$	-	++	+	-
$\gamma 2$	+	++	++	++

Figura 4.3. Receptor GABA-A y su distribución en cerebelo⁴⁶.

4.4.3. El papel del ión Cloro

El GABA puede ejercer su función como neurotransmisor gracias a sus diferentes receptores de membrana. Es especialmente relevante el papel del receptor GABA-A, que como veíamos anteriormente, es una proteína pentamérica que forma un canal para el Cloro. De ahí que vayamos a dedicar cierta atención al papel que desempeña el ión Cloro en el cambio de papel o de función que se observa en el GABA a lo largo del desarrollo.

Como veíamos al hablar del entorno iónico, en el cerebro de animales adultos, la liberación del GABA por la célula presináptica, permite que éste se una a su receptor, el GABA-A, produciéndose la apertura del canal de Cloro, iniciándose la entrada de éste en la célula, por un gradiente electroquímico, que a su vez

genera la hiperpolarización de la membrana y un potencial postsináptico de tipo inhibitorio¹⁰⁹. Pero esto que ocurre en el animal adulto, no es lo que sucede durante el desarrollo como hemos visto, siendo crucial el papel que juega tanto el receptor del GABA - GABA-A – por un lado, como la concentración de ión Cloro por otro.

Las sinapsis inhibitorias mediadas por el GABA maduran gradualmente durante el primer mes de vida postnatal^{47, 48}. Estos IPSP son debidos a la apertura de los canales de Cloro que forma el receptor GABA-A y a la entrada de Cloro, lo cual hiperpolariza la membrana, se producen gracias al gradiente de Cloro que atraviesa la membrana de la neurona.

Las neuronas presentan canales de Cloro, tanto dependientes de voltaje como no-dependientes de voltaje⁴⁹, hay neuronas en las que el Cloro solo se mueve a través de la membrana por potenciales eléctricos o por gradientes de concentración, como se ha podido comprobar, ya que la conductancia del Cloro puede ser tanto voltaje-dependiente como activada por el neurotransmisor GABA⁴⁹. En estas células el Potencial de reversión del Cloro $E_{Cl^-} = -70 \text{ mV}^{14}$, es prácticamente igual al potencial de reposo de la membrana, es decir $V_m = -60 \text{ mV}^{109}$.

La concentración del ión Cloro intracelular también parece estar implicada en otras diversas funciones, como el mantenimiento del volumen celular y el control del ciclo celular⁵⁰. El ión Cloro también participa en el mantenimiento del potencial de reposo de la membrana de una neurona, junto a otros iones, como el Na^+ y K^+ ¹⁰⁹. En animales adultos, las neuronas corticales mantienen este gradiente de Cloro a través de un transporte activo de Cloro hacia fuera de la célula –sistemas de extrusión del Cloro -, pero en neuronas inmaduras la falta de eficacia o de desarrollo de estos sistemas de extrusión del Cloro podrían ser los responsables en el cambio positivo en el E_{Cl^-} y por lo tanto en la respuesta de despolarización de las células⁴⁸. Durante el proceso de desarrollo las neuronas acumulan Cloro de forma activa, en su interior, pero al alcanzar la madurez la concentración de Cloro intracelular decrece y es cuando se produce el cambio hacia la función inhibitoria⁵¹. Esto implicaría que los transportadores de Cloro jueguen un papel importante en su homeostasis⁵¹.

El descenso de la concentración de Cloro en el animal adulto, también tiene que ver con otros factores: hay un descenso de agua en el cerebro que es inversamente proporcional con el aumento de lípidos y de proteínas. Además en los primeros días de vida el espacio extra-neuronal esta ocupado por fluido intersticial con muy pocas células de glía. Pero progresivamente aumenta el denominado “**índice de glía**” es decir el cociente entre la densidad de la neuroglia con la densidad de las neuronas. El hecho de que aumente la densidad de la glía con la edad es importante con respecto al descenso de la concentración Cloro, ya que en el animal adulto el espacio intersticial esta ocupado por glía, lo que reduce el Cloro libre⁵². Otros autores plantean que el transporte de GABA de alta afinidad alcanza en PND-15 unos niveles de entre el 170-190% del nivel del animal adulto. Tanto las neuronas como la glía contribuyen por igual a la re-captación del GABA de alta afinidad durante este periodo de PND-15⁵³. Así mismo debemos recordar que durante este periodo postnatal los ratios entre neurona/glía se incrementan 12 veces en la corteza y 4 veces en el estriado, desde el nacimiento hasta la edad adulta⁵³.

En estudios realizados con células embrionarias de medula espinal y bulbo olfativo en ED-15, se observa que existen corrientes eléctricas como respuesta a la aplicación de GABA, en concentraciones micromolares 2-10 μ M-; que pasan por la activación de canales de Cloro⁵⁴. Estos canales cuando están abiertos, se despolariza la membrana celular hasta -30mV, es decir hasta conseguir alcanzar el potencial de reversión del Cloro en células embrionarias de medula espinal⁵⁴. Estos datos concuerdan con otros realizados in-vitro con motoneuronas embrionarias de medula espinal de rata y con neuronas de hipocampo postnatales. Otros autores han observado que en preparaciones de hipocampo, la respuesta de los canales de Cloro a la aplicación del GABA, se convierte de despolarizante a hiperpolarizante durante la segunda semana de vida postnatal⁵⁵, aunque algunos otros autores la adelantan unos días⁵⁶. Todos estos resultados parece que van confirmando la idea que durante el desarrollo, en el periodo embrionario y postnatal, el GABA despolariza las células en relación con su potencial de membrana en reposo y que se va

produciendo un progresivo descenso de la magnitud de la despolarización debido a los cambios en el gradiente del Cloro⁵⁴.

Cuadro sinóptico:

Desarrollo embrionario y postnatal	Animal adulto
<ul style="list-style-type: none">• $[Cl^-]_{intracelular}$:• $[Cl^-]_{extracelular}$:• Potencial de reversión del Cl: -30 mV• Potencial de membrana: -60 mV• Las células acumulan Cl^- de forma activa. <p>Proceso: Liberación de GABA, unión al receptor GABA-A, que se abre y es un canal de Cloro, el Cl sale de la célula hasta llegar a su potencial de equilibrio, a -30 mV, por lo que la membrana se ha despolarizado: EPSP.</p>	<ul style="list-style-type: none">• $[Cl^-]_{intracelular}$: 7 mM• $[Cl^-]_{extracelular}$: 140 mM• Potencial de reversión del Cl: -58 mV• Potencial de membrana: -60 mV• Presentan transportes activos para sacar Cl de la célula. <p>Proceso: Liberación de GABA, unión al receptor GABA-A, que se abre y es un canal de Cloro, el Cl entra en la célula, hasta llegar a su potencial de equilibrio, a -58 mV, por lo que la membrana se ha hiperpolarizado: IPSP.</p>

Figura 4.4.

Visto desde el otro prisma, el GABA aplicado a las neuronas de hipocampo durante la primera semana de vida postnatal provoca una respuesta de despolarización. Esta despolarización de la membrana resulta de la salida de iones Cloro de la célula, a través del los canales iónicos GABA-A, siendo en ese momento el gradiente de Cloro de salida; la fuerza que genera la salida del Cloro puede estar generada o mantenida por moléculas que mantienen la concentración intracelular del ión por encima del equilibrio electroquímico⁵⁶. Si

tenemos en cuenta que el potencial de reversión o de equilibrio del Cloro en la fase embrionaria es -30 mV^{54} , como hemos visto anteriormente. El potencial de reversión o de equilibrio del Cloro de la fase adulta es -58 mV^{109} , es evidente que en un caso la entrada de Cloro en la célula la despolariza, mientras que en el otro caso hiperpolariza. Siendo este el posible motivo último del cambio de función del GABA – de despolarización de la membrana celular a hiperpolarización de la misma - que han observado los diversos autores.

Por lo tanto, parece lógico preguntarse qué ocurre a lo largo del desarrollo con los gradientes de Cloro, cuales son y como maduran los sistemas de entrada y de salida del Cloro. Debido al cambio de mentalidad que supuso en la comunidad científica el hecho de que el clásico neurotransmisor inhibitor actuara como “*excitador*” durante la fase del desarrollo, gran cantidad de trabajos se han realizado en esta dirección, localizándose varios tipos de transportadores del Cloro, y estudiándose su proceso de expresión a lo largo del desarrollo. Los canales de Cloro también están siendo ampliamente estudiados por sus implicaciones en canalopatías genéticas ligadas a la epilepsia en humanos^{118, 57}.

Los cambios en la concentración del Cloro, se deben a dos tipos de moléculas, unas meten Cloro dentro de la célula -intrusión-, mientras que las otras lo sacan –extrusores-. Los cambios en la concentración de Cloro intracelular a lo largo del desarrollo, están mediados por los cambios producidos durante el desarrollo en las proteínas transportadoras⁵⁰. Estas proteínas actúan como co-transportadoras de cationes y Cloro, además de intercambiadores⁵⁸. Todos ellos están regulados a lo largo de este periodo, presentando un patrón de expresión espacio-temporal único que sugiere que tanto el Cloro como sus mecanismos de regulación de concentración y entorno iónico, juegan un papel crítico en el control del desarrollo neural⁵⁰. Algunos autores apoyan la hipótesis de que el co-transportador $\text{K}^+\text{-Cl}^-$ (KCC) parece ser el mayor responsable de este proceso⁵⁸.

Sistemas de intrusión de Cloro: Se han estudiado aquellas moléculas que ayudan a acumular el ión Cloro, aumentando la concentración a nivel intracelular. Sabemos que las neuronas inmaduras acumulan Cloro en su interior y hay algunos transportadores que le ayudan a ello, como por ejemplo el co-transportador, $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ ⁵⁹ - también denominado a través de sus siglas como NKCC -. El NKCC presenta un patrón de expresión durante el desarrollo que implica variaciones temporo-espaciales; en ED-17, trabajando con células corticales, ya se detecta la presencia de NKCC, en el soma y en las dendritas⁵⁹, su presencia va incrementando paulatinamente, alcanzando un punto máximo en PND-7, disminuyendo paulatinamente desde PND-14, para luego desaparecer en el adulto⁶⁰. Este patrón de desarrollo se ha observado tanto en corteza, como en hipocampo, cerebelo, y tractos de sustancia blanca⁶⁰. En otros estudios centrados el patrón de distribución de NKCC en hipocampo, se observa que en la primera semana de desarrollo postnatal, esta proteína estaba restringida a los cuerpo celulares de la capa piramidal, mientras que posteriormente desaparece, y en cambio aparece en las dendritas de células piramidales y no piramidales, siendo este cambio de localización concomitante al cambio funcional de despolarización a hiper-polarización⁵⁶.

Este transportador presenta varias isoformas, siendo la isoforma 1 la que parece ser mas importante y se la denomina -NKCC1-⁶¹. La isoforma NKCC-1 se detecta en cerebro, expresándose en neuronas, inicialmente en el estrato cortical, pero no en las zonas ventriculares o subventriculares, y sus niveles de expresión alcanzan un pico máximo en PND-21, manteniéndose a lo largo de la vida adulta⁵¹. La captación de Cloro que provoca la despolarización por GABA en las neuronas en desarrollo del neocortex de rata, es mediada por NKCC1⁶², y parece que favorecería la aparición de convulsiones en el cerebro en desarrollo⁶³.

A día de hoy podemos observar que todavía existe cierta controversia entre los autores sobre esta molécula y sus isoformas, ya que en el párrafo anterior decíamos que desaparecía y ahora que solo cambia de localización.

	Función	Periodo	Nombre	Siglas
Sistemas de intrusión de Cloro	Entrada de Cloro a la célula. Aumenta la $[Cl^-]_{intracelular}$. GABA: Despolariza	Periodos de desarrollo embrionario y postnatal	$Na^+-K^+-Cl^-$ cotransportador	NKCC Isoformas: NKCC1
Sistemas de extrusión de Cloro	Salida de Cloro de la célula. Aumenta la $[Cl^-]_{extracelular}$. GABA: Hiperpolariza	Animal adulto	K^+-Cl^- cotransportador	KCC Isoformas: KCC-1 KCC-2

Figura 4.5 Sistemas de intrusión y extrusión de Cloro.

Sistemas de extrusión: En cambio, existe otro tipo de moléculas que actúan como bombas de Cloro, para sacar de la célula iones de forma activa, los denominados sistemas de extrusión. Su función es mantener la diferencia de concentración entre el interior de la célula y el exterior. Como veíamos en la introducción en neuronas adultas la concentración de Cl intracelular $[Cl^-]_i = 7$ mM, frente a una concentración extracelular de $[Cl^-]_e = 140$ mM¹⁰⁹. Por ello cuando se produce una interacción macromolecular entre el GABA y su receptor GABA-A, se produce un cambio conformacional y se abre el canal de Cloro, que es la molécula pentamérica del receptor GABA-A. Los iones Cloro entran por la diferencia de concentración existente, y provocando que el interior de la célula se haga más negativa, lo cual genera un potencial inhibitorio; ya que la célula tendría que recibir más entradas de información excitadora para lograr llegar al umbral de excitación y generar un potencial de acción excitatorio¹⁰⁹.

Estas moléculas que ayudan a sacar el Cloro fuera de la célula después de la producción de un potencial inhibitorio postsináptico, IPSP, para restablecer el

potencial de reposo, son proteínas co-transportadoras. Y también presentan patrones de desarrollo en las diferentes isoformas, siendo algunos de ellos muy diferentes. Por ejemplo, el KCC-1 se expresa prenatalmente con niveles bajos, y los incrementa ligeramente a lo largo del desarrollo. En cambio KCC-2, no se expresa prenatalmente, aparece en el periodo perinatal y aumenta tremendamente después de la primera semana de vida postnatal⁵¹. Por lo tanto el KCC-2 sería la molécula mas significativa desde el punto de vista del cambio de función del GABA, ya que su patrón temporal coincide. El KCC-2, es un co-transportador K⁺/Cl⁻, que saca Cl⁻ de la célula, y parece que el cambio de respuesta mediado por el receptor GABA-A de despolarización a hiperpolarización, esta acoplado con la expresión neuronal de esta molécula⁶⁴. Varios autores proponen que el KCC-2 es el principal mecanismo de sacar Cloro fuera de la célula^{64, 65}. Se ha propuesto que la expresión de KCC-2 es necesaria y suficiente para terminar con el periodo despolarizante del GABA e iniciar la hiperpolarización, y la expresión de KCC-2 comienza durante la segunda semana de vida de desarrollo postnatal⁶⁶. Otros autores asignan a esta molécula un papel critico en la construcción de circuitos GABAérgicos durante el periodo postnatal^{67, 68, 69}. Otros autores que estudiando el nivel de expresión a través de anticuerpos específicos para una región específica de la proteína KCC2, observan que KCC2 tiene unos niveles mínimos al nacer pero aumenta significativamente durante el desarrollo postnatal y esto es el patrón opuesto al co-transportador Na-K-2Cl – NKCC -que se expresa de forma abundante en el cerebro inmaduro y disminuye durante el desarrollo postnatal⁷⁰, lo cual volvería a confirmar su patrón temporal con el cambio de función del GABA.

A nivel anatómico se ha estudiado la localización de KCC-2, hallándose en retina de rata adulta, localizándose en células horizontales, células bipolares, células amacrinas y células ganglionares; la expresión de KCC-2 comienza en PND-1 en las zonas internas y en PND-7 en las zonas externas, llegando a los niveles de adulto en PND-14⁶⁶. El KCC-2 se ha estudiado en cerebelo de rata, encontrándose que la distribución es en los cuerpos celulares y dendritas

de células amacrinas, co-localizándose con los receptores del GABA⁶⁵, así como en el núcleo coclear⁶⁸, y otras áreas del tronco del encefalo⁶⁹.

Queremos realizar un apunte a la importancia que puede tener la glia, en el mantenimiento de la concentración extracelular del Cloro a lo largo del desarrollo pre y postnatal, al llegar a la edad adulta, así como en el mantenimiento de un patrón estable. Concretamente los astrocitos juegan un papel fundamental en la homeostasis del sistema, ya que se ha observado que están ampliamente implicados en todos estos procesos^{71,72}.

Además la maduración de la homeostasis del Cloro, se ha demostrado que es dependiente de la función cerebral y de la experiencia a la que este expuesto el animal. En un estudio realizado en sistema auditivo de rata, relacionado con el momento de inicio de la audición - la cual ocurre entre PND-10/12 -, se realizó ablación de las entradas ipsilaterales o contralaterales en el LSO – Oliva Superior Lateral - desde la cóclea, antes de la fecha de inicio de la audición, cuando los canales de Cl⁻ todavía son despolarizantes; observándose que esta falta de función o exposición a los estímulos de entrada, impide que exista el refinamiento de los circuitos mediados por GABA del LSO y una activación posterior de la inhibición correcta⁵⁸.

Para terminar, pondremos de manifiesto que los cambios en la concentración intracelular del Cloro a lo largo del periodo de desarrollo, pueden tener implicaciones no menos importantes sobre otros iones intracelulares, como el Ca²⁺, o en moléculas que actúen a través de él. El GABA se ha descrito como señal trófica durante el desarrollo cortical, facilitando el crecimiento neurítico y se le ha ligado con los canales tipo-L de Ca²⁺⁷³. Así mismo las concentraciones intracelulares de Cloro afectan a ciertas proteínas-G, a través de los receptores GABA-B, que juegan un papel muy importante en la regulación de la excitabilidad neuronal⁷⁴.

4.5. Vuelve a aparecer un gradiente de maduración funcional caudo-cefálico donde el GABA pasa de actuar como despolarizante a hiperpolarizante de la membrana postsináptica.

A día de hoy, existen numerosos trabajos publicados sobre este tema en las diferentes zonas cerebrales. En este proceso de cambio, observamos que no es un proceso restringido a ciertas áreas cerebrales, sino que aparece a todos los niveles estudiados. Recorriendo el SNC como una oleada, desde niveles sub-corticales hasta niveles corticales superiores. Este proceso se produce en el tiempo, desde las etapas iniciales del desarrollo postnatal, llegando al individuo adulto, donde el sistema ya está perfectamente preparado para la función clásica de la inhibición. El desarrollo de la inhibición se caracteriza por modificaciones coordinadas que implican: los sistemas de neurotransmisores, la cinética de la liberación de vesículas, los gradientes de Cloro, la expresión de diferentes sub-unidades del receptor GABA-A, así como el número de entradas sinápticas⁷⁵, como hemos visto en el punto anterior.

A continuación vamos a analizar las diferentes áreas cerebrales y las fechas que proponen los diferentes autores para el cambio de función. Recordar que el cambio de función no depende fundamentalmente de la célula que libera el GABA - presináptica - sino de la célula que expone los receptores del GABA - postsináptica -, así como de los extrusores de Cl-.

Medula espinal: En medula espinal, el GABA y la glicina son los neurotransmisores inhibidores de la rata adulta, funcionando a través de corrientes de Cloro. Pero se ha detectado que el GABA produce despolarización en neuronas de medula durante el periodo embrionario, desde ED-16, cuando se comienza a medir hasta PND-1/2, momento a partir del cual el GABA produce inhibición⁷⁶. Otros autores trabajando con motoneuronas de la zona lumbar encuentran que en PND-0/4 ya hay inhibición, pese a la naturaleza despolarizante⁷⁷. Autores trabajando el asta dorsal encuentran que en PND-1 y PND-2 la aplicación de GABA produce despolarización en el 40% de las células y avanzando en el tiempo en PND-6 y PND-7 la aplicación del

GABA ya solo produce respuestas hiperpolarizantes⁷⁸. En medula espinal también hay una inhibición de la actividad de la inspiración, en las raíces ventrales de C4, en neonatos⁷⁹.

Esto nos hace pensar en un periodo crítico de transición en la naturaleza del GABA que además se podría correlacionar con la expresión transitoria del GABA, ya que en ED-13 cuando se detecta por primera vez, aparecen un 0,5% de células inmunoreactivas, este porcentaje va aumentando hasta llegar al 50% entre PND-7/10 para disminuir hasta el 20% en PND-21⁸⁰.

La despolarización inducida por GABA, en un periodo crítico, puede ser importante para la diferenciación celular porque activa canales de Ca^{+2} -voltaje dependientes e incrementa el Ca^{+2} -intracelular, lo que promueve la supervivencia de las células⁸¹. Cuando se extraen células del asta dorsal de la medula espinal de rata y se cultivan, inicialmente el 90% de ellas responden al GABA y a la glicina generando una elevación transitoria de Ca^{+2} -intracelular, pasados 30 días en cultivo, estas células maduran en su aspecto y ya todas las neuronas responden al GABA y a la glicina con una respuesta de hiperpolarización⁸².

Este periodo crítico de transición también se ha correlacionado a nivel funcional, ya que la diferencia entre la maduración de las corrientes inhibitorias de GABA y los extrusores de Cloro podría ser el motivo de la hipersensibilidad que presentan los crías de rata a estímulos nociceptivos⁸³.

Tronco del encéfalo: En preparaciones del tronco del encéfalo, que contenían el ganglio del trigémino se estudiaron desde ED-13 hasta PND-6, observándose que ya en ED-15 había algún tipo de respuesta, y la excitación GABAérgica estaba presente en todas las edades pero era máxima entre ED-20 y PND-1⁸⁴. Algunos otros estudios nos dan datos más concretos mostrándonos que el cambio de naturaleza del GABA de despolarizante a hiperpolarizante se lleva a cabo en un periodo de al menos dos semanas, dependiendo del núcleo que estemos estudiando. Por ejemplo en el núcleo medial superior de la oliva (MSO) se produce entre el PND- 5 y PND-9, mientras que en el núcleo superior paraoliva (SPN) se produce entre ED-18 y

PND-1, el núcleo medial del cuerpo trapezoide (MNTB) se produce en PND-10 y en el núcleo lateral superior de la oliva (LSO) se produce entre PND-4 y PND-5⁸⁵. Otros núcleos del tronco del encéfalo directa o indirectamente relacionados con el control respiratorio también presentan un periodo transitorio hasta PND-12 donde está cambiando el equilibrio entre excitación e inhibición⁸⁶.

Estudios realizados en colículo superior, ponen de manifiesto que las corrientes GABAérgicas pasan a ser inhibitorias entre PND-1 y PND-21, pero con un punto de inflexión importante en PND-6 y más marcado incluso entre PND-12 y PND-15, justo en los días en los cuales se empiezan abrir los ojos de las crías⁸⁷. Parece que existe la necesidad de que los circuitos GABAérgicos maduren justo antes de abrir los ojos, ya que el GABA contribuye a la inducción de la LTD -long term depresión, en sus siglas en inglés- en el colículo superior en desarrollo⁸⁸.

Hipotálamo: En neuronas de hipotálamo de rata en desarrollo también se ha detectado una naturaleza transitoria del GABA, ejerciendo acciones excitadoras con una actividad dosis-dependiente en células embrionarias y postnatales tempranas, pero convirtiéndose en inhibidor en neuronas de individuos adultos⁸⁹. Teniendo en cuenta que la función neuro-secretora de las neuronas hipotalámicas donde el ritmo y la sincronización de las descargas es fundamental, el equilibrio entre la excitación mediada por glutámico y la inhibición mediada por GABA⁹⁰ son fundamentales.

Hipocampo: Posiblemente este es el área cerebral donde mas trabajos se han realizado sobre el papel del GABA, de las sinapsis GABAérgicas y su cambio de polaridad durante el desarrollo, así como del desarrollo coordinado entre la excitación y la inhibición para el normal funcionamiento de los circuitos cerebrales^{91, 92}. El papel excitador del GABA durante el desarrollo en el hipocampo esta mediado por los receptores GABA-A y es dependiente de Cloro^{93, 94}.

En el hipocampo de rata adulta la inhibición sináptica mediada por el sistema GABAérgico juega un papel crucial evitando la expansión descontrolada de la

actividad excitadora mediada por el ácido glutámico¹²⁸. Este trabajo se realiza a través de la hiperpolarización de la célula post-sináptica mediada por los receptores GABA-A y los receptores GABA-B, además el GABA también limita la liberación del neurotransmisor actuando a través de los receptores GABA-B presinápticos⁹⁵. Pero en el desarrollo embrionario y postnatal el GABA media la mayoría de las corrientes excitatorias⁹, los receptores GABA-A inducen despolarización y excitación en las células piramidales CA3 aumentando el Ca^{+2} intracelular, durante la primera semana de vida postnatal -PND-7-, así mismo lo confirman los estudios realizados in-vitro⁹⁶. Aunque en otros trabajos proponen que las células del hipocampo el cambio del GABA de despolarizante a hiper-polarizante ocurre después de la segunda semana postnatal⁷⁶.

En el periodo del desarrollo en el cual ocurre la descarga sincrónica de GABA por parte de las inter-neuronas del hipocampo generando potenciales de acción puede tener una función neurotrófica para refinar los circuitos hipocámpicos^{97, 98}. La ventana temporal en la cual ocurre esto coincide con un patrón particular de actividad de los circuitos neurales hipocámpicos caracterizado por periódicos Potenciales Gigantes Despolarizantes –GPD-, estas descargas sincrónicas de las neuronas GABAérgicas excitadoras a través de los receptores GABA-A y los receptores de glutámico, generando oscilaciones sincrónicas de Ca^{+2} intracelular⁹⁹. Los GPD pueden participar en la formación de unidades funcionales en el hipocampo, generando una interconexión eléctrica entre neuronas que forman parte de un circuito que debe quedar perfectamente ensamblado¹³⁴. Es sorprendente que el patrón de maduración en el hipocampo sigue la misma secuencia de conectividad que en el desarrollo, es decir: primero silencio, en segundo lugar GABA lento - despolarizante-, tercer lugar glutámico y en cuarto lugar GABA rápido - hiperpolarizante-¹⁰⁰. Así pues, parece que la señalización GABAérgica juega un papel fundamental en el ajuste del circuito hipocámpico durante el desarrollo postnatal¹⁰¹.

Corteza cerebral: En la corteza cerebral de mamíferos encontramos entre un 15-25% de neuronas GABAérgicas, dependiendo de las especies y del área examinada¹⁰². El desarrollo postnatal de los potenciales sinápticos en el neocortex de rata se caracteriza por la aparición secuencial de sinapsis excitadoras e inhibitorias, con un periodo de máxima sinaptogénesis que ocurre entre PND-11 y PND-20. Durante este periodo se va desarrollando la inhibición mediada por el GABA. Las células piramidales responden de forma cada vez mas eficaz con EPSPs; estos potenciales postsinápticos gradualmente maduran durante el periodo final de desarrollo postnatal y son fundamentales para la supervivencia y maduración de la población GABAérgica¹⁰². Parece que el retraso del desarrollo de la inhibición sináptica en el neocortex es una ventaja ya que promueve la plasticidad sináptica aunque simultáneamente incrementa la susceptibilidad a las convulsiones¹⁰³.

Como ya hemos dicho anteriormente se ha demostrado en cortes de tejido embrionario y neonatal de corteza de rata, que el GABA produce respuestas excitadoras, a través de los receptores GABA-A y esta actividad esta mediada por gradientes de Cloro¹⁰⁴. Esta despolarización de la membrana puede influir en los sucesos que ocurren en el desarrollo del neocortex, incluida la neurogénesis y la sinaptogénesis, ya que implican cambios en la concentración intracelular del Ca^{+2} ¹⁰⁵.

En ciertos estudios realizados en corteza somatosensorial se observa que la actividad inhibitoria del GABA esta retrasada con respecto a los procesos excitadores¹⁰⁵. Este retraso se observa tanto a nivel celular como a nivel sináptico y es que el sistema GABAérgico parece estar implicado en la remodelación de circuitos y plasticidad neuronal, procesos ligados a la experiencia y el aprendizaje, para lograr un adecuado funcionamiento de esas áreas corticales¹⁰⁶.

Finalmente, tanto en corteza como en otras áreas, el cambio de papel del GABA de excitador a inhibidor en las fases tempranas del desarrollo postnatal, parece estar ligado a los cambios ocurridos en el receptor GABA-A, y en los mecanismos que controlan la concentración del Cloro, como poníamos de

manifiesto en el punto anterior de la discusión. El receptor GABA-A es una molécula compleja, con numerosas subunidades, con una gran familia génica y múltiples posibilidades de regulación temporo-espacial. Una variable importante a tener en cuenta, en próximos estudios es el hecho de que la expresión del receptor GABA-A está modulada por neuroesteroides^{106, 107}, lo cual puede tener importantes repercusiones en la estructuración de los circuitos excitadores e inhibidores del SNC.

4.6. Cuando se alcanza la edad adulta el GABA esta plenamente maduro tanto a nivel anatómico como a nivel funcional, convirtiéndose en el neurotransmisor inhibitor más importante del SNC de vertebrados.

Al terminar el periodo postnatal de desarrollo cerebral, así como el cambio de función en la naturaleza del GABA, nos encontramos un SNC estructurado tal como aparece en el individuo adulto, con un patrón de distribución del GABA como el que veíamos en la introducción y plenamente funcional en los circuitos inhibitorios. Pero cabe preguntarse al final de todo este recorrido ¿Por qué la inhibición es tan importante en el funcionamiento cerebral?.

Uno de los principios básicos de la neurociencia actual parte del presupuesto de que la estructura y la función del SNC están íntimamente ligadas; por cada función motora o acto mental que se produzca, hay un circuito cerebral responsable de ella. Siendo el trabajo de muchos científicos lograr encontrar dichos circuitos neurales responsables de tales funciones. Además cualquier modelo teórico que pretenda explicar la función del SNC debe dar una explicación razonable de la integración de la función a nivel excitación e inhibición del sistema en general y de dichos circuitos en particular. Estos circuitos cerebrales, integrados por unidades excitadoras y unidades inhibitoras, se activan en un momento dado y cual de todos los posibles subconjuntos de circuitos que actúan, se podría decidir de acuerdo a los principios de competición selectiva que mejor se ajuste a las necesidades adaptativas de cada momento, tal y como propone Edelman¹⁰⁸.

Para la excitación se ha encontrado que el neurotransmisor más potente es el ácido glutámico, de la misma manera que para la inhibición es el GABA. ¿Será por su semejanza estructural? ¿La transformación de ambos a cargo de la glía, tiene algo que decirnos? A nivel cortical este diálogo se está estudiando actualmente y esperamos que los próximos años sean fructíferos. En regiones subcorticales nos encontramos con la dopamina en la sustancia nigra y en el área tegmental ventral que es esencial para la función de los ganglios basales; la acetilcolina en el núcleo basal de Meynert e implicada en la memoria; la norepinefrina en el locus ceruleus y la serotonina en el núcleo del Raphe, ambos modulando aspectos mas globales del procesamiento del estímulo incluido el nivel de alerta y el componente emocional, entre otros. El balance global de las actividades neuroquímicas excitadoras e inhibitoras esta en la base de todos los procesos cerebrales y por extensión de la estabilidad del sistema¹³.

La función excitadora y el ácido glutámico han sido ampliamente estudiados, pero comparativamente la función inhibitoria en el campo de la neurociencia no ha sido tan ampliamente estudiada, si bien hay autores que han dedicado su trayectoria al estudio del GABA, sus receptores, su neuroquímica y las sinapsis GABAérgicas^{109, 110}. Ya que el GABA es responsable de gran parte de la inhibición que se lleva a cabo en el SNC, los problemas que aparezcan tiene virtualmente un gran efecto en su funcionamiento, especialmente en la aparición de convulsiones, pero también en otros trastornos¹¹¹. Tenemos algunos claros ejemplos de este papel fundamental que ejerce la inhibición, en trastornos como la Corea de Huntington, entre otros, que pasamos a detallar a continuación.

La Corea de Huntington es un trastorno hereditario que suele comenzar a provocar síntomas clínicos en la 3ª o 4ª década de vida. Se inicia por movimientos en sacudidas de las articulaciones individuales y continua con movimientos distorsionados graves y progresivos de todo el cuerpo. Además lleva asociado a las disfunciones motoras una demencia paulatina que termina siendo grave. Se piensa que estos movimientos incontrolados son

consecuencia de la pérdida progresiva de la mayoría de los cuerpos celulares de las neuronas GABAérgicas del núcleo caudado y el putamen¹¹². Las terminales axónicas de estas neuronas normalmente producen la inhibición del globo pálido y de la sustancia nigra, y la pérdida de esta inhibición es lo que causa los estallidos espontáneos de actividad del globo pálido y la sustancia nigra que producen los movimientos de distorsión¹¹³.

Los sistemas de flujo de información: En el desarrollo de la ruta visual de humanos, la vía de inhibición de retorno se desarrolla entre los 6-8 meses de vida, y es un mecanismo por el cual se impide que la atención visual se devuelva a un lugar recientemente procesado, de forma que permite que continuemos explorando nuestro campo visual con una adecuada relación espacio-temporal, atendiendo a nuevos estímulos. Esta función está regulada por la maduración progresiva del colículo superior, del pulvinar y del lóbulo parietal¹¹⁴.

Los núcleos talámicos ejercen una modulación temprana sobre la entrada sensorial¹¹⁵, existen además otros sistemas de control de los flujos de información basados en la teoría de los controles. Las aproximaciones de las redes informáticas han permitido hacer aplicable al procesamiento sensorial algunas formas de entender el flujo de información en sistemas modulares¹¹⁶. De forma que a nivel talámico nos encontramos con dos sistemas de control: el balance de la señal y la modulación de la entrada¹¹⁵.

A nivel cortical encontramos varios sistemas de control inhibitorio¹¹⁴:

- Retroalimentación: modulación de la señal de una forma retrograda, como una retroalimentación positiva -reforzamiento- o como retroalimentación negativa -debilitación-.
- Anteroalimentación: la magnitud de la señal de algunos circuitos neuronales influye en circuitos posteriores, actuando de forma anterograda positiva o negativa.
- Inhibición y acentuación distales: Permiten que los circuitos neuronales de niveles superiores como corteza motora o mesencéfalo puedan modular el flujo

de información en circuitos de menos nivel (eg: circuitos corticales sobre los núcleos talámicos).

Las convulsiones: Parece que el origen de las convulsiones o epilepsia esta en una descarga incontrolada de las neuronas excitadoras por una falta de inhibición adecuada, pensándose en una anormalidad bioquímica en las neuronas GABAérgicas¹¹⁷. Teniendo en cuenta el impacto de esta patología en humanos, durante los últimos años se ha trabajado intensamente en modelos animales de epilepsia, basados en el estudio de las células GABAérgicas así como en los receptores de dicho neurotransmisor¹¹⁸, especialmente en ratas.

Cuando se han estudiado epilepsias del lóbulo temporal, la estimulación del hipocampo induce episodios agudos de estatus epilépticos en ratas, observándose que hay un aumento de excitabilidad y un descenso de inhibición en las células piramidales CA1 en animales epilépticos¹¹⁹.

Se ha comprobado que las células extraídas de cerebros inmaduros presentan unas características fisiológicas que las hace más vulnerables a la epileptogénesis¹²⁰. Existe una ventana en el desarrollo postnatal, donde las neuronas corticales reciben una poderosa entrada sináptica a través de los receptores NMDA de duración y latencia variable, que les hace presentar mayor sensibilidad a la epileptogénesis, esta susceptibilidad no se da ni en animales recién nacidos ni en animales adultos, y puede ser en parte consecuencia de la relativa inmadurez del sistema de inhibición mediado por GABA¹²¹. Parece que durante el periodo perinatal hasta PND-7, la capacidad de sintetizar GABA es más alta (74,1% del basal). Posteriormente en PND-28¹²² se produce un 44,1% del basal. Las neuronas del hipocampo son especialmente vulnerables al desarrollo de convulsiones durante periodo de transición de función excitadora a inhibitoria^{123, 124}.

Como hemos visto anteriormente, en el neocortex de la rata, entre PND-11 y PND-20 se produce un periodo de máxima sinaptogénesis, periodo en el cual se desarrolla la inhibición GABAérgica, la falta de inhibición funcional en

periodos tempranos del desarrollo permitiría una gran actividad neural y una plasticidad sináptica aumentada para formar las conexiones sinápticas adecuadas. Podría parecer que esta falta de inhibición sobre los procesos excitadores aumentaría la vulnerabilidad de la corteza a convulsionar¹²⁵. En los estudios recientes, hay una creciente evidencia de que la epilepsia está mediada por alteraciones en el receptor GABA-A, de hecho se ha asociado una mutación en uno de los genes que codifican la amplia familia de sub-unidades con un tipo de epilepsia familiar^{126, 118}. Así mismo en las epilepsias idiopáticas se pueden generar convulsiones al aplicar picrotoxina, que como sabemos actúa como antagonista del receptor GABA-A¹²⁶.

De la lectura de estos y otros muchos trabajos, llegamos a la conclusión de la importancia que tenía realizar un estudio sobre la aparición del GABA durante el periodo embrionario, postnatal y en el animal adulto, ya que es uno de los primeros neurotransmisores que aparece, y el mas importante en la inhibición de cerebro de mamíferos. Como además el GABA no se sintetiza en un área específica del cerebro y desde ahí ejerce su función, como seria el caso de las catecolaminas¹²⁷, sino que se sintetiza in-situ, nos propusimos la realización de unos mapas ya que aparecía en todas las áreas cerebrales que se han estudiado. Todo ello nos permitiría confirmar o refutar nuestra hipótesis de partida.

GABA versus Glutámico

Pero hablar de los procesos de excitación e inhibición no es tan simple como hablar de los dos neurotransmisores mas implicados en el campo de la inhibición y la excitación: GABA y Glutámico. Si bien es imprescindible comprender su estructura y función, es en la correlación donde ambos adquieren toda su dimensión; podríamos decir que el total – la función cerebral – es mas que la suma de las partes – inhibición versus excitación-.

En nuestro trabajo partimos de la hipótesis de que este dialogo entre excitación e inhibición necesita una estructura cerebral organizada para lograr dar una

respuesta motora adaptativa. Esta estructura cerebral, en mamíferos, pasa por diferentes estadios de maduración hasta lograr la organización neurológica del animal adulto, esto es: el desarrollo embrionario, el desarrollo postnatal y estadio de adulto.

Nuestra hipótesis de partida sería:

“La inhibición es tan importante en el S.N.C. que antes de empezar a ser activa la respuesta excitadora o la función motora tiene que estar organizado un sistema de inhibición, para prevenir la destrucción del sistema”.

Esta hipótesis partía de los diferentes estudios sobre patologías que implican un mal funcionamiento de los sistemas inhibitorios y sus consecuencias sobre la función del S.N.C.

Estos dos neurotransmisores - ácido glutámico y GABA - están especialmente implicados en la regulación de la cito arquitectura cerebral, ya que las interacciones entre ambos regulan el crecimiento neurítico, como se ha visto en neuronas de hipocampo de rata¹²⁸. En animales adultos el GABA previene la regresión dendrítica que es inducida por Glutámico¹²⁸. Si se aplica Glutámico en concentraciones menores a 10 μ m se detiene el crecimiento de neuritas, si se aumenta la concentración se reduce la longitud de las mismas y si llegamos a concentraciones mayores de 100 μ m se detiene también el crecimiento axonal, frente al GABA que actúa como promotor de la sinaptogénesis y del crecimiento neurítico. En cualquier caso hace falta un nivel de actividad eléctrica óptima para el crecimiento neurítico, ya que un exceso de excitación por efecto del Glutámico como un exceso de inhibición por efecto del GABA, puede suprimir el crecimiento de las neuronas¹²⁸.

En neuronas cultivadas, que proceden de embriones de rata, de diferentes zonas como el hipocampo, la región septal y el neocortex, se observa que en todas ellas se desarrolla antes la sensibilidad al GABA que la sensibilidad al

Glutámico, es decir los receptores GABAérgicos aparecen antes que los receptores glutaminérgicos¹²⁹. Estudios en otras áreas así lo confirman: los receptores del GABA preceden en su aparición a los receptores de Glutámico en el desarrollo de hipotálamo, siendo las neuronas embrionarias del hipotálamo sensibles a la liberación del GABA¹³⁰.

Pero una vez han aparecido los receptores de Glutámico, estos son mas sensibles a la regulación de factores producidos por el entorno local, como aquellos producidos por astrocitos, que los receptores del GABA que se muestran mas insensibles a ellos¹³⁰.

Para la formación de sinapsis en el SNC se piensa que hay un proceso de reconocimiento entre la neurona presináptica y la neurona postsináptica que las lleva a formar un circuito definitivo, y se observa que en la formación de los lugares de liberación de Glutámico hay una fuerte influencia de factores ligados a la célula diana, en cambio la formación de sinapsis funcionales GABAérgicas es independiente del tipo de neurona diana, sugiriendo otro tipo de control¹³¹. De hecho en la formación de los circuitos GABAérgicos en la ruta visual de rata en el colículo superior se forman de forma independiente a la actividad visual¹³², no así en la excitación, donde se sabe que la entrada de información - los inputs- sensoriales producen un refinamiento de los mapas topográficos, ligada a la plasticidad dependiente de actividad.

Además en células de corteza de rata cultivadas se observa que el GABA tiene un efecto modulador en la liberación de Glutámico en la sinapsis y este proceso se realiza a través de los receptores GABA-A¹³³.

En el hipocampo de rata, durante el desarrollo pre y postnatal temprano, todo este proceso ha sido ampliamente estudiado y se observa que las neuronas GABAérgicas de los días ED-16/17 y sus sinapsis se desarrollan antes que las glutaminérgicas, que lo hacen en los días ED-16/21¹³⁴. Así mismo los estudios de arborización sugieren que las inter neuronas GABAérgicas maduran y

arborizan antes que las células piramidales, y son las sinapsis GABAérgicas las primeras que se establecen sobre las células piramidales¹³⁴.

La actividad eléctrica del hipocampo en la primera semana de vida postnatal se caracteriza por unos Potenciales Gigantes Despolarizantes, espontáneos que son el resultado de la actividad eléctrica GABAérgica y glutaminérgica, es decir ínter neuronas y células piramidales descargando sincrónicamente. Estas oscilaciones que parece que actúan accionadas en red, pueden participar en la formación de unidades neuronales funcionales: siguen la regla hebbiana "neuronas que disparan juntas se conectan juntas"¹³⁴.

Así mismo en el hipocampo, durante la transición entre el periodo juvenil y el adulto, cuando el GABA pasa de ser un neurotransmisor que despolariza a un neurotransmisor que hiperpolariza, se produce una maduración de las reglas de inducción de la potenciación a largo plazo, para que se produzca este proceso parece que la inhibición GABAérgica es imprescindible, dándose el cambio en el papel de los receptores GABA-A¹³⁵.

Durante el desarrollo embrionario y la primera etapa de vida postnatal hay una superproducción y abundancia de neuronas y sinapsis tanto a nivel excitador como inhibidor. Durante este periodo de sinaptogénesis pasamos por ciclos de formación y de regresión de sinapsis, donde estas van ha cambiar de tipo, forma, número y función. Estos cambios se producen tanto por factores genéticos como epigenéticos y darán lugar a enagramas o registros neurales de larga duración. Pero en el concepto clásico de sinapsis hebbiana, una neurona que se usa repetidamente se refuerza y adquiere mayor eficacia, potenciándose a largo plazo. Así mismo se eliminan aquellas que no hayan sido estimuladas. Una sinapsis así reforzada descende el umbral de respuesta o necesita estímulos de menor intensidad para responder¹³⁶.

Tanto las conexiones excitadoras como las inhibitorias son necesarias para determinar las propiedades de la respuesta neural de un circuito y su comportamiento. Se ha estudiado abundantemente la sinaptogénesis de la

excitación y como se refinan sus circuitos tanto por eliminación de ciertas sinapsis como por el fortalecimiento de otras. Pero se han realizado muchos menos trabajos en demostrar como se organizan los circuitos inhibitorios. Esto es debido, en parte a la dificultad técnica que supone el hecho de que la inhibición este ligada, en general, a interneuronas repartidas entre neuronas excitadoras.

REFERENCIAS DE LA DISCUSIÓN:

- ¹ Illera M, Illera JC, Illera J. El ratón y la rata. Editorial complutense. Madrid 1991.
- ² Huttenlocher PR. Neural plasticity. The effects of environment on the development of the cerebral cortex. Harward University Press. London 2002.
- ³ Diamond MC. Enriching Heredity. The impact of the environment on the anatomy of the brain. The Free Press. New York 1988.
- ⁴ Gilliespie DC, Kim G, Kandler K. Inhibitory synapsis in the developing auditory system are glutaminergic. Nat Neurosci. 2005 Mar; 8(3):332-8.
- ⁵ Walmsley B, Berntson A, Leao RN, Fyffe RE. Activity-dependent regulation of synaptic strength and neuronal excitability in central auditory pathway. J. Physiol. 2006 Feb; Epub ahead of print.
- ⁶ Otsuka M. GABA and some other transmitter candidates in the nervous system. Proceedings of the V International Congress on Pharmacology. 1973; 4: 186-201.
- ⁷ Gallager DW, Kehne JH, Wakeman EA, Davis M. Developmental changes in pharmacological responsivity of the acoustic startle reflex: effects of picrotoxin. Psychopharmacology. 1983; 79(2-3): 87-93.
- ⁸ Seno N, Saito K. The development of the dorsal root potential and the responsiveness of the primary afferent fibers to gamma-aminobutyric acid in the spinal cord of rat fetuses. Brain research. 1985;349(1-2): 11-16.
- ⁹ Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. GABA: and excitatory transmitter in early postnatal life. Trends in neurosciencevol 1991; 14(12): 515-519.
- ¹⁰ Strata F, Atzori M, Molnar M, Ugolini G, Berretta N, Cherubini E. Nitric oxide sensitive depolarization-induced hyperpolarization: a posible role for gap junctions during development. European Journal of neuroscience. 1998; 10:397-403.
- ¹¹ Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Khazipov R. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. Advances in neurology. 1999; 79: 189-201.
- ¹² Hebb D. The Organization of Behavior: A neuropsychological theory. Wiley.1949. New York.

- ¹³ Gordon E. (editor). Integrative Neuroscience. Bringing together biological, psychological and clinical models of the human brain. Hardwood academic publishers. 2000. Ámsterdam.
- ¹⁴ Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM. Principles in Neural Science. 3º ed New York. Elsevier; 1991.
- ¹⁵ Tsukada M, Pan X. The spatiotemporal learning rule and its efficiency in separating spatiotemporal patterns. *Biol. Cybern.* 2005 Feb; 92(2):139-46.
- ¹⁶ Pike FG, Meredith RM, Holding AW, Paulsen O. Rapid report: postsynaptic bursting is essential for "Hebbian" induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *J. Physiol.* 1999 Jul; 518 (2):5711-6.
- ¹⁷ Chechik G, Meilijson I, Ruppin E. Effective neuronal learning with ineffective Hebbian learning rules. *Neural Comput.* 2001 April; 13(4):817-40.
- ¹⁸ Kim G, Kandler K. Elimination and strengthening of glycinergic/GABAergic connections during tonotopic map formation. *Nat. neuroscience* 2003; 6: 282-290.
- ¹⁹ Issa NP. Inhibitory circuits in sensory maps develop through excitation. *Trends in neuroscience* 2003 Sep; 26(9): 456-458.
- ²⁰ Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of nurture. *Nature Reviews. Neuroscience* 2002 Sep; 3(9):728-739.
- ²¹ Cobas A, Fairen A, Alvarez-Bolado G, Sánchez MP. Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: a comparative study of distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABA-A receptor. *Neuroscience* 1991; 4(2) : 375-397.
- ²² Hevers W, Luddens H. Pharmacological heterogeneity of gamma-aminobutyric acid receptors during development suggest distinct classes of rat cerebellar granule cells in situ. *Neuropharmacology* 2002; 42(1) : 34-47.
- ²³ Laurie D, Widsen W, Seeburg PH. The distribution of thirteen GABA-A receptor subunit mRNAs in the rat brain III. Embryonic and postnatal development. *The journal of neuroscience* 1992; 12(11) : 4151-72.
- ²⁴ Gambarana C, Beattie CE, Rodríguez ZR, Siegel RE. Region-specific expression of Messenger RNAs encoding GABA-A receptor subunits in the developing rat brain. *Neuroscience*. 1991; 45(2): 423-32.
- ²⁵ Araki T, Kiyama H, Tohyama M. GABA-A receptor subunit Messenger RNAs show differential expression during cortical development in the rat brain. *Neuroscience* 1992; 51 (3) : 583-91.
- ²⁶ Ma W, Saunders PA, Somogy R, Poulter MO, Barker JL. Ontogeny of GABA-A receptor subunit mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Journal of comparative neurology*. 1993; 338(3):337-59.
- ²⁷ Serafín R, Ma W, Maric D, Maric I, Lahjouji F, Siegart W, Barker JL. Initially expressed early rat embryonic GABA-A receptor Cl⁻ ion channels exhibit heterogeneous channel properties. *Eur Journal of neuroscience* 1998; 10(5): 1771-83.
- ²⁸ Poulter MO, Barker JL, O'Carroll AM, Lolait SJ, Mahan LC. Co-existent expression of GABA-A receptor beta 2, beta 3, and gamma 2, subunit Messenger RNAs during embryogenesis and early postnatal development of the rat central nervous system. *Neuroscience* 1993; 53(4):1019-33.
- ²⁹ Serafini R, Valayev AY, Barker JL, Poulter MO. Depolarizing GABA-activated Cl⁻ channels in embryonic rat spinal and olfactory bulb cells. *Journal of physiology* 1995; 488(2) : 371 – 386.
- ³⁰ Poulter MO, Barker JL, O'Carroll A.M, Lolait S, Mahan LC. Differential and transient expression of GABA-A receptor alpha-subunit mRNAs in the developing rat CNS. *Journal of neuroscience* 1992; 12 (8) : 2888-900.
- ³¹ Carpenter MK, Parker I, Miledi R. Expression of GABA and glycine receptors by Messenger RNAs from the developing rat cerebral cortex. *Proceedings of the royal society of London* 1988; 234(1275): 159-70.

-
- ³² Van Eden CG, Parmar R, Lichtensteiger W, Schlumpf M. Laminar distribution of GABA-A receptor alpha 1, beta 2, and gamma 2 subunits mRNAs in the granular and agranular frontal cortex of the rat during pre and post natal development. *Cerebral cortex* 1995; 5(3) : 234-46.
- ³³ Mohrmann R, Werner M, Hatt H, Gottmann K. Target-specific factors regulate the formation of glutaminergic transmitter release sites in cultured neocortical neurons. *The journal of neuroscience* 1999; 19(22) : 10004-13.
- ³⁴ Owens DF, Liu X, Kriegstein AR. Changing properties of GABA(A) receptor-mediated during early neocortical development. *J. Neurophysiol.* 1999 Aug; 82(2):570-83.
- ³⁵ Fritschy JM, Paysan J, Enna A, Moler H. Switch in the expresión of the rat GABA-A receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *The journal of neuroscience* 1994; 14 (9): 5302-24.
- ³⁶ Liu Q, Wong-Riele MT. Developmental changes in the expresión of GABA(A) receptor subunits alpha 1, alpha 2, and alpha 3 in the brain stem nuclei of the rats. *Brain Res.* 2006 Jun; Epub ahead of print.
- ³⁷ Jussofie A. Steroid modulation of central nervous GABA-A receptor binding in three female rat brain areas during postnatal development. *Developmental neuroscience* 1995; 17 (5-6) : 335-42.
- ³⁸ Xia Y, Hadad GG. Ontogeny and distribution of GABA-A receptors in the rat brainstem and rostral brain regions. *Neuroscience* 1992; 49(4) : 973-89.
- ³⁹ Didelon F, Mladinic M, Cherubini E, Bradbury A. Early espression of GABA-A receptor delta subunit in neonatal rat hippocampus. *The journal of neuroscience* 2000; 62 (5) : 638 – 43.
- ⁴⁰ Thompson CL, Pollard S, Stephenson FA. Developmental regulation of expresión of GABA-A receptor alpha 1 and alpha 6 subunits in cultured rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacology* 1996; 35(9-10) : 1337-46.
- ⁴¹ Montpied P, Yan GM, Paul SM, Morrow AL. Transient increase in cerebellar transcriptional activity precedes the expresión of GABA-A receptor alpha 6 subunit mRNA during postnatal maturation. *Developmental neuroscience* 1998; 20(1) : 74-82.
- ⁴² Garrett KM, Duman RS, Saito N, Blume AJ, Vitek MP, Tallman JF. Isolation of a cDNA clone for the alpha subunit of the uman GABA-A receptor. *Biochemical and biophysical research communications* 1988; 156(2): 1039-45.
- ⁴³ Zhang JH, Satpo M, Tahyama M. Different postnatal development profiles of neurons containing distic GABA-A receptor beta subunit mRNAs (beta 1, beta 2, and beta 3) in the rat forebrain. *The journal of comparative neurology.* 1991; 308(4) : 586-613.
- ⁴⁴ Gibbs JW 3rd, Schroder GB, Coulter DA. GABA-A receptor function in developing rat thalamic reticular neurons: whole cell recordings of GABA-mediated currents and modulation by clonazepam. *The journal of neurophysiology* 1996; 76(4) : 2568-79.
- ⁴⁵ Feleder C, Ginzburg M, Wuttke W, Moguilevsky JA, Arias P. Gabaergic activation inhibits the hypothalamic-pituiary-ovaric axis and sexual development in the immature female rat. Associated changes in hypothalamic glutamatergic and taurinergic systems. *Developmental brain research* 1999 ; 116 (2) : 151-7.
- ⁴⁶ Tohyama M, Takatsuji K. Atlas of neuroactive sustances and their receptors in the rat brain. Ed. Oxford University Press, ed japonesa 1993 trad inglesa 1997.
- ⁴⁷ Miller MW. Development of projection and local circuit neurons in neocortex. *Cerebral Cortex*, New York: Plenum 1988, vol 7; 133-175.
-

- ⁴⁸ Luhmann HJ, Prince DA. Postnatal maturation of the gabaergic system in rat neocortex. *The journal of neurophysiology* 1999; 65 (2): 247-263.
- ⁴⁹ Segal M, Barker JL, Owen DG. Chloride conductances in central neurons. *Isr J Med Sci.* 1987 Jan-Feb; 23(1-2):95-100.
- ⁵⁰ Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C. Patterns of cation-chloride cotransporter expresión during embrión rodent CNS development. *Eur J Neurosci.* 2002 Dec; 16(12):2358-70.
- ⁵¹ Clayton GH, Owens GC, Wolf JS, Smith RL. Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expresión in rat neocortex. *Developmental brain research* 1998; 109(2): 281-92.
- ⁵² Vernadakis A, Woodbury DM. Electrolyte and amino acid changes in rat brain during maturation. *Am Journal Physiol.* 1962; 203: 748-752.
- ⁵³ Wong P.T. et all. Postnatal changes of GABAergic and glutamatergic parameters. *Brain-Res.* 1981; 227(4):519-29.
- ⁵⁴ Serafín R, Valayev AY, Barker JL, Poulter MO. Depolarizing GABA-activated Cl⁻ channels in embryonic rat spinal and olfactory bulb cells. *Journal of physiology* 1995; 488(2) : 371 – 386.
- ⁵⁵ Valeyev AY, Cruciani RA, Lange GD, Smallwood VS, Barker JL. Cl⁻ channels are randomly activated by continuous GABA secretion in culured embryonic rat hippocampal neurons. *Neuroscience letters* 1993; 155: 199-203.
- ⁵⁶ Marty S, Wehrle R, Alvarez-Leefmans FJ, Gasnier B, Sotelo C. Postnatal maturation of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter expresión and inhibitory sinaptogénesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical análisis. *European Journal of neurosciences* 2002; 15(2) : 233-45.
- ⁵⁷ Rivera C, Voipio J, Kaila K. Two developmental switches in gabaergic signalling: K⁺Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J.Physiol.* 2005 May; 564 (3): 953.
- ⁵⁸ Shibata S, Kakazu Y, Okabe A, Fukuda A, Nabekura J. Experience-dependent changes in intracellular Cl⁻ regulation in developing auditory neurons. *Neuroscience research* 2004; 48: 211-220.
- ⁵⁹ Sun D, Murali SG. Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in immature cortical neurons: A role in intracelular Cl⁻ regulation. *Journal of neurophysiology* 1999; 81(4): 1939-48.
- ⁶⁰ Plotkin MD, Zinder EY, Hebert SC, Delpire E. Expresión of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a posible mechanims underlying GABA's excitatory role in immature brain. *Journal of neurobiology.* 1997; 33(6): 781-95.
- ⁶¹ Schomberg SL, Bauer J, Kintner DB, Su G, Flemmer A, Forbush B, Sun D. Cross talk between the GABA-A receptor and the Na-K-Cl cotransporter is mediated by intracellular Cl⁻. *J Neurophysiol.* 2003 Jan; 89(1): 159-67.
- ⁶² Yamada J.Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurons is mediated by NKCC-1. *J.physiol.* 2004 Jun; 557(3):829-41.
- ⁶³ Dzhalal VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain.. *Nat Med.* 2005; 11(11):1205-13.
- ⁶⁴ Rivera C. Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Latineen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC-2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999; 397(6716): 251-5.

- ⁶⁵ Williams JR, Sharp JW, Kumari VG, Wilson M, Payne JA. The neuron-specific K-Cl cotransporter, KCC2. Antibody development and initial characterization of the protein. *The journal of biological chemistry* 1999; 274(18) : 12656-64.
- ⁶⁶ Vu TQ, Payne JA, Copenhagen DR. Localization and developmental expresión patterns of neuronal K-Cl cotransporter (KCC2) in the rat retina. *The journal of neuroscience* 2000; 20(4): 1414-23.
- ⁶⁷ Chudotvorova I, Ivanov A, Rama S, Hubner CA, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Medina I. Early expresión of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expresión of functional synapses. *J.Physiol.* 2005 Aug;566(3): 671-9.
- ⁶⁸ Vale C, Caminos E, Martinez-Galan JR, Juiz JM. Expression and developmental regulation of the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 in the cochlear nucleus. *Hear Re.* 2005 Aug; 206(1-2): 107-15.
- ⁶⁹ Ren J, Greer JJ. Modulation of respiratory rhythmogenesis by chloride-mediated conductances during the perinatal period. *J. Neurosci.* 2006 Apr; 26(14):3721-30.
- ⁷⁰ Lu J, Karadshed M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J. Neurobiol.* 1999 Jun 15;39(4):558-68.
- ⁷¹ Liu QY, Schaffner AE, Chang YH, Maric D, Barker JL. Persistent activation of GABA-A receptor / Cl⁻ channels by astrocyts derived GABA in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 2000 Sep; 84 (3): 1392-403.
- ⁷² Lin SC, Bergles DE. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat.neuroscience.* 2004 Jan; 7(1): 24-32.
- ⁷³ Maric D, Liu QY, Maric I, Chaudry S, Chang YH, Smith SV, Sieghart W, Fritschy JM, Barker JL. GABA exprssion dominates neuronal lineage progresión in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA-A autoreceptor/Cl⁻ channels. *The journal of neuroscience.* 2001; 21(7) : 2343-60.
- ⁷⁴ Lenz RA, Pilter TA, Alger BE. High intracelular Cl⁻ concentrations depress G-protein-modulated ionic conductances. *The journal of neuroscience* 1997; 17(16) : 6133-41.
- ⁷⁵ Awatramani GB, Turecek R, Trussell LO. Staggered development of gabaergic and glycinergic transmisión in the MNTB. *J.neurophysiol.* 2005 Feb; 93(2):819-28.
- ⁷⁶ Wu W, Ziskind-Conhaim L, Sweet MA. Early development of glycine and GABA – mediated synapses in rat spinal cord. *The journal of neuroscience.* 1992 Oct; 12(10):-3935-3945.
- ⁷⁷ Marchetti C, Pagnotta S, Donato R, Nistri A. Inhibition of spinal or hypoglossal motoneurons of the newborn rat by glycine or GABA. *European journal of neurosciences.* 2002 Mar; 15(6): 975-83.
- ⁷⁸ Baccei ML, Fitzgerald M. Development of GABAergic and glycinergic transmisión in neornatal rat dorsal horn. *J.neuroscience.* 2004 May; 24(20):4749-57.
- ⁷⁹ Su CK, Chai CY. GABAergic inhibition of neonatal rat phrenic motoneurons. *Neuroscience letters.* 1998 Jun; 248(3): 191-4.
- ⁸⁰ Schaffner AE, Behar T, Nadi S, Barker JL. Quantitative análisis of transient GABA exprssion in embryonic and early postnatal rat spinal cord neurons. *Developmental brain research.* 1993; 72: 265-276.
- ⁸¹ Reichling DB, Kyrozis A, Wang J, MacDermott AB. Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transient in rat dorsal horn neurons. *Journal of physiology* 1994; 476: 411-421
- ⁸² Wang J, Reichling DB, Kyrozis A, MacDermott AB. Developmental loss of GABA and glycine-induces depolarization and Ca²⁺ transients in embryonic rat dorsal horns neurons in culture. *European journal of neuroscience.* 1994; 6(8):1275-80.

- ⁸³ Cordero-Erausquin M, Coull JA, Boudreau D, Rolland M, De Koninck Y. Differential maturation of GABA actino and anion reversal potencial in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J Neurosci*. 2005 Oct; 25(42):9613-23.
- ⁸⁴ Waite PM, Ho SM, Henderson TA. Afferent ingrowth and onset of activity in the rat trigeminal nucleus. *European journal of neuroscience*. 2000 Aug; 12(8): 2781-92.
- ⁸⁵ Lohrke S, Srinivasan G, Oberhofer M, Doncheva E, Friauf E. Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine actions occurs at different perinatal ages in the superior olivary complex nuclei. *Eur J Neurosci*. 2005 Dic; 22(11): 2708-22
- ⁸⁶ Lui Q, Wong-Riley MT. Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei. *J Appl Physiol*. 2005 Apr; 98(4):1442-57.
- ⁸⁷ Henneberger C, Jutter R, Schmitd SA, Walter J, Meier JC, Rothe T, Grantyn R. Glu-R and TrkB-mediated maturation of GABA receptor function during the perior of eye opening. *Eur J Neurosci*. 2005 Jan; 21(2):431-40.
- ⁸⁸ Mize RR, Salt TE. Contribution of GABAergic inhibition to synaptic response and LTD early in postnatal development in the rat superior colliculus. *Eur. J Neurosci*. 2004 Sep; 20(5):1331-40.
- ⁸⁹ Chen G, Trombley PQ, Van del Pol AN. Excitatory actions of GABA in deveolping rat hypothalamic neurones. *The journal of physiology*. 1996 Jul; 494 (2): 451-64.
- ⁹⁰ Misgeld U, Zeilhofer HU, Swandulla D. Synaptic modulation of oscillatory activity of hypothalamic neuronal networks in vitro. *Cellular and molecular neurobiology* 1998 Feb; 18(1): 29-43.
- ⁹¹ Zhao X, Shoji S, Lau P. Balanced GABAergic and glutaminergic synapses development in hippocampal neurons. *Biochem.biophys. res. Común*. 2005 May; 20: 330.
- ⁹² Colin-LeBrun I, Ferrand N, Caillard O, Tosetti P, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL. Spontaneous synaptic activity is required for formation of functional GABAergic synapses in the developing rat hippocampus. *J. physiol*. 2004 Aug; 559(1): 129-139.
- ⁹³ Obrietan K, Van del Pol A. GABA-B receptor-mediated regulation of glutamate activaed calcium transients in hypothalamic and cortical neuron development. *The journal of neurophysiology*. 1999 Jul; 82(1): 94-102.
- ⁹⁴ Perrot-Sinal TS, Davis AM, Gregerson KA, Kao JP, McCarthy MM. Estradiol enhaces excitatory gamma-aminobutyric acid-mediated calcium signaling in neonatal hypothalamic neurons. *Endocrinology*. 2001 Jun; 142(6): 2238-43.
- ⁹⁵ Gaiarsa JL, McLean H, Congar P, Leinekugel X, Khazipov R, Tseeb V, Ben-Ari Y. Postnatal maturation of gamma-aminobutyric acid A and B –mediated inhibition in the CA3 hippocampal region of the rat. *The journal of neurobiology*. 1995 Mar; 26(3): 339-49.
- ⁹⁶ Berninger B, Marty S, Zafra F, da-Penha-Berrzaghi M, Thoenen H, Lindholm D. GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expresión in rat hippocampal neurons during maturation in vitro. *Development* 1995 Aug; 121(8): 2327-35.
- ⁹⁷ Strata F, Atzori M, Molnar M, Ugolini G, Tempai F, Cherubini E. A pacemaker current in dye-coupled hilar interneurons contributes to the generation of giant gabaergic potentials in developing hippocampus. *The journal of neuroscience* 1999 Feb; 17(4):1435-1446.
- ⁹⁸ Kasyanov AM, Safiulina VF, Voronin LL, Cherubini E. GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *PNAS*. 2004 Mar; 101(11): 3967-3972.

- ⁹⁹ Khazipov RN, Zefirov AL, Ben-Ari Y. GABA- the basic mediator of excitation in the early stages of hippocampal development. *Usp-Fiziol-Nauk*. 1998 Apr-Jun; 29(2): 55-67.
- ¹⁰⁰ Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci*. 2005 Nov; 25(44):10074-86.
- ¹⁰¹ Safiulina VF, Fattorini G, Conti F, Cherubini E. GABAergic signaling at mossy fiber synapses in neonatal hippocampus. *J Neurosci*. 2006 Jan; 26(2):597-608.
- ¹⁰² De Lima AD, Opitz T, Voigt T. Irreversible loss of subpopulation of cortical interneurons in the absence of glutamatergic network activity. *Eur. Journal neuroscience*. 2004 Jun; 19(11): 2931-43.
- ¹⁰³ Sutor B, Luhmann HJ. Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potential in the rat neocortex. *Perspectives on developmental neurobiology*. 1995; 2(4): 409-19.
- ¹⁰⁴ Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Krisegstein AR. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. *The journal of neuroscience* 1996 Oct; 16(20):6414-23.
- ¹⁰⁵ Micheva KD, Beaulieu C. Development and plasticity of the inhibitory neocortical circuitry with emphasis on the rodent barrel field cortex: a review. *Canadian journal of physiology and pharmacology*. 1997 May; 75(5): 470-8
- ¹⁰⁶ Grobin A, Heenan E, Lieberman J, Morrow A. Perinatal neurosteroid levels influence gabaergic interneuron localization in adult rat prefrontal cortex. *The journal of neuroscience*. 2003 Mar; 23(5): 1832-1839.
- ¹⁰⁷ Hernandez-Tristan R, Leret ML, Almeida D. Effect of intrauterine position on sex differences in gabaergic system and behavior of rats. *Physiol. Behav*. 2006 Mar; 87(3):625-33.
- ¹⁰⁸ Adams P. Hebb and Darwin. *J Theor Biol*. 1998 Dec; 195(4):419-38.
- ¹⁰⁹ Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles in neural science*. 3^o ed. New York: Elsevier; 1991.
- ¹¹⁰ Gaiarsa JL. Plasticity of gabaergic synapses in the neonatal rat hippocampus. *Neuroscience review series. J. cell. mol. med*. 2004; 8(1): 31-37.
- ¹¹¹ Guin C, Bottiglieri T, Carter O. GABA, γ -hydroxybutyric acid and neurological disease. *Ann Neurol* 2003; 54(6):3-12.
- ¹¹² Alberch J, Canals JM. Transplantes de neuronas GABAérgicas en enfermedades neurodegenerativas. *Mente y Cerebro. Investigación y Ciencia*. 2005. 12; 50-51.
- ¹¹³ Guyton AC. *Anatomía y fisiología del sistema nervioso. Neurociencia básica*. 2^a ed. Trad. Dra D. Klayn. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, S.A.; 1994.
- ¹¹⁴ Zuluaga JA. *Neurodesarrollo y estimulación*. Bogota, Colombia: Editorial Medica Panamericana Ltda; 2001.
- ¹¹⁵ Smith CM. *Elements of molecular neurobiology*. 2nd ed. John Wiley & son Ltd; 1997.
- ¹¹⁶ Fodor JA. *La modularidad de la mente*. Trad: JM. Igoa. Madrid: Editorial Morata S.A.; 1986
- ¹¹⁷ Carlson NR. *Fisiología de la conducta*. 6^a ed ingles. Barcelona: Editorial Ariel Neurociencia; Oct 1999.
- ¹¹⁸ Maestría en neurociencia y biología del comportamiento 2005. Sección II. Características de los componentes celulares del tejido nerviosos. Tema 6: Canales iónicos. Viguera Editores. Disponible info@viguera.com. 2005; 231-234
- ¹¹⁹ Mangan PS, Bertram EH. Ontogeny of altered synaptic function in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Brain research*. 1998 Jul; 799(2): 183-96.

- ¹²⁰ Krisegstein AR, Suppes T, Prince DA. Cellular and synaptic physiology and epileptogenesis of developing rat neocortical neurons in vitro. *Brain research*. 1987 Aug; 431(2): 161-71.
- ¹²¹ Luhmann HJ, Prince DA. Transient expresión of polysynaptic NMDA receptor-mediated activity during neocortical development. *Neuroscience letters*. 1990 Mar; 111(1-2): 109-15.
- ¹²² Sankar R, Shin DH, Wasterlain CG. GABA metabolism during status epilepticus in the developing rat brain. *Developmental brain research*. 1997 Jan; 98(1): 60-4.
- ¹²³ Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL. Developmental changes in gabaergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *The european journal of neuroscience* 2004 Feb; 19(3): 590-600.
- ¹²⁴ Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL. Developmental changes in gabaergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur. Journal neuroscience*. 2004 Feb; 19(3): 590-600.
- ¹²⁵ Sutor B, Luhmann HJ. Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Perspect. dev neurobiol*. 1995;2(4):409-19.
- ¹²⁶ Kapur J. Role of GABA-A receptor-mediated inhibition in the patogénesis of generalized seizures. *Experimental neurology*. 2003; 184: 1-2.
- ¹²⁷ Smeets W, Reiner A. Phylogeny and development of the catecholamine system in the CNS of vertebrate. Cambridge University Press. Cambridge 1994.
- ¹²⁸ Mattson MP. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain research reviews*. 1988; 13: 179-212.
- ¹²⁹ Koller H, Siebler M, Schmalenbach C, Muller HW. GABA and glutamate receptors development of cultured neurons from rat hippocampus, septal region and Neocortex. *Synapse*. 1990; 5(1): 59-64.
- ¹³⁰ Chen G, Trombley PQ, Van del Pol AN. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *The journal of physiology*. 1996 Jul; 494 (2): 451-64.
- ¹³¹ Morhmann R, Werner M, Hatt H, Gottman K. Target-specific factors regulate the formation of glutaminergic transmitter release sites in cultured neocortical neurons. *The journal of neuroscience* 1999; 19(22): 10004-13.
- ¹³² Perouansky M, Grantyn R. Development of gabaergic synaptic connections in-vivo and in cultures from rat superior colliculus. *Developmental Brain research*. 1990 Mar; 52 (1-2): 95-111.
- ¹³³ Torimitsu K, Niwa O. Real time detection of GABA-induced synaptic glutamate release in cultured rat cortex. *Neuroreport*. 1997 Apr; 8(6): 1353-8.
- ¹³⁴ Hammond C. Cellular and molecular neurobiology. Cap. 23: Maduración del circuito hipocámpico. 23º ed. New York: Academic Press; 2001.
- ¹³⁵ Meredith RM, Floyer-Lea AM, Paulsen O. Maturation of long-term potentiation induction rules in rodent hippocampus: role of GABAergic inhibition. *The journal of neuroscience*. 2003; 2(35) : 11142-11146.
- ¹³⁶ Nieto Sampedro M. Plasticidad neural. Mente y cerebro. *Investigación y Ciencia*. 2003; 4: 11-19.

V. CONCLUSIONES

Después del trabajo realizado, podemos plantear ciertas conclusiones, que pensamos nos pueden permitir avanzar en el conocimiento y la comprensión de algunos principios básicos de la neurociencia actual.

Una teoría unificadora de toda la función cerebral esta aún muy lejana, pero algunos principios organizadores van estando mas claros. Cualquier modelo que pretenda explicar el funcionamiento cerebral debe integrar los procesos excitadores e inhibidores, así como los flujos de información que de ellos se derivan. Esta posible teoría unificadora de la función cerebral debe tener en cuenta que el SNC presenta una gran carga genética pero que simultáneamente está sometido a la interacción con el entorno que permite una gran plasticidad en los circuitos y que estos circuitos responsables del comportamiento estarán sometidos a procesos de selección natural: genética, medio ambiente, selección..., el escenario es complejo.

A partir del trabajo realizado nos atrevemos a proponer los siguientes conclusiones:

1. El neurotransmisor GABA es el neurotransmisor inhibitor más importante en el cerebro de mamíferos adultos.
2. El desarrollo ontogenético del neurotransmisor GABA es complejo y se prolonga a lo largo del periodo embrionario y el periodo postnatal.
3. Durante el desarrollo del neurotransmisor GABA este sufre transformaciones estructurales y funcionales.
4. Durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano la función del GABA es despolarizar la neurona postsináptica.
5. La transformación de la función del neurotransmisor GABA depende del cambio de la estructura de los receptores, especialmente del receptor GABA-A y de la concentración del ión Cloro en el medio.
6. El periodo durante el cual el sistema gabaérgico actúa como despolarizante coincide con un periodo critico de maduración de los

sistemas neurales, ya que según la ley de Hebb, *“sistemas que disparan juntos funcionan juntos”*.

7. La patología ligada a los problemas de inhibición en la edad adulta como la epilepsia, parecen ligados a la ineficacia ó dificultad de la transformación de la función despolarizante a hiperpolarizante de forma fluida en ese momento clave del desarrollo.
8. Todo esto convierte al sistema gabaérgico en este periodo de transición clave para la comprensión de diferentes enfermedades y patologías así como su tratamiento.
9. El sistema gabaérgico se puede convertir en este periodo en una diana farmacológica pero es necesario seguir investigando en esta dirección.

Somos conscientes de que este trabajo deja muchas cuestiones sin resolver y que haría falta continuar con el estudio pormenorizado de algunas de ellas que no son el objeto de esta tesis. Sirva como ejemplo algunas que planteamos para continuar investigando en el futuro:

- Estudiar la importancia de los periodos madurativos tanto a nivel anatómico como funcional.
- Profundizar en el estudio del dialogo excitación-inhibición en la construcción de los circuitos cerebrales y por ende en el funcionamiento cerebral.
- Continuar con el estudio pormenorizado del periodo de transición del neurotransmisor GABA como despolarizante a hiperpolarizante en las diferentes estructuras cerebrales. Así como las implicaciones funcionales del cambio de papel del neurotransmisor.
- La posibilidad de encontrar una diana farmacológica para este periodo de transición que es concordante con el periodo de vulnerabilidad a las convulsiones y que permitiera mejorar la vida de esos pacientes.

VI. Bibliografía

- Aaland M. Adobe photoshop elements 2. Trad de la 1º edición inglesa. Ediciones Anaya Multimedia. Madrid. 2003.
- Adair JG. Vohra N. The explosion of knowledge, references and citations: psychology's unique response to a crisis. *Ame psychologist*. 2003; 58(1): 15-23.
- Adams P. Hebb and Darwin. *J Theor Biol*. 1998 Dec; 195(4): 419-38.
- Adini Y, Sagi D, Tsodyks M. Context-enabled learning in human visual system. *Nature*. 2002 Feb; 415(6):790-3.
- Alakuijala A, Palgi M, Wegelius K, Schmidt M, Enz R, Paulin L, Saarma M, Pasternack M. GABA receptor rho subunit in the developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005 Jan; 154(1):15-23.
- Alberch J, Canals JM. Transplantes de neuronas gabaérgicas en enfermedades neurodegenerativas. *Mente y Cerebro. Investigación y Ciencia*. 2005. 12; 50-51.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.D. *Molecular Biology of the Cell*. 1 st ed. New York & Londres : Garland Publishing Inc; 1983.
- Altman J. Bayer SA. Embryonic development of the rat cerebellum. I Delineation of the cerebellar primodium and early cell movements. *The journal of comparative neurology*. 1985 Jan; 231(1): 1-26.
- Altman J. Bayer S. Development of precerebellar nuclei in the rat: I. The precerebellar neuroepithelium of the rhombencephalon. *The Journal of comparative neurology*. 1987 Mar; 257 (4): 477-489.
- Altman J. Bayer S. Development of precerebellar nuclei in the rat: II. The intramural olivary migratory stream and the neurogenetic organization of the inferior olive. *The journal of comparative neurology*. 1987 Mar; 257 (4) :490-512.
- Altman J. Bayer S. Development of precerebellar nuclei in the rat: IV. The anterior precerebellar extramural migratory stream and the nucleus

- reticularis tegmenti pontis and the basal pontine gray. The journal of comparative neurology. 1987 Mar; 257 (4): 529-552.
- Altman J. Bayer SA. Development of the rat thalamus:I. Mosaic organization of the thalamic neuroepithelium. The journal of comparative neurology. 1988 Sep; 275(3): 346-377.
 - Altman J. Bayer SA. Development of the rat thalamus: II. Time and site of origin and settling pattern of neurons derived from anterior lobule of the thalamic neuroepithelium. The journal of comparative neurology. 1988 Sep; 275(3): 378-405.
 - Altman J. Bayer AS. Development of the rat thalamus:III. Time and site of origin and settling pattern of neurons of the reticular nucleus. The journal of comparative neurology. 1988 Sep; 3: 4006-428.
 - Altman J. Bayer A.S. Development of the rat thalamus: IV. The intermediate lobule of the thalamic neuroepithelium, and the time and site of origin and settling pattern of neurons of the ventral nuclear complex. The journal of comparative neurology. 1989 Jan; (4) : 543-566.
 - Altman J. Bayer A.S. Development of the rat thalamus: V. The posterior lobule of the thalamic neuroepithelium and the time and site of origin and settling pattern of medial geniculate body. The journal of comparative neurology. 1989 Jun; 4:567-580.
 - Altman J. Bayer S. Vertical compartmentation and cellular transformations in the germinal matrices of the embryonic rat cerebral cortex. Experimental neurology. 1990 Jan; 107(1) : 23-35.
 - Altman J. Bayer SA. Mosaic organization of the hippocampal neuroepithelium and the multiple germinal sources of the dentate granule cells. The journal of comparative neurology. 1990 Nov; 301(3): 325-342
 - Altman J. Bayer S.A. Atlas of prenatal rat brain development. CRC Press, Inc. Florida. 1995.
 - Altman J. Bayer S. Regional differences in the stratified transitional field and the honeycomb matrix of developing human cerebral cortex. Journal of neurocytology. 2002 Sep; 31(8-9): 613-632.

- Alvarez-Bolado G. Swanson LW. Developmental brain maps: structure of the embryonic rat brain. Ed. Elsevier Science B.V. New York. 1996.
- Amadeo A, De Biasi S, Frassoni C, Ortino B, Spreafico R. Immunocytochemical and Ultrastructural study of the rat perireticular thalamic nucleus during postnatal development. *The Journal of comparative Neurology* 1998; 392: 390-401.
- Amantea D, Tessari M, Bowery NG. Reduced G-protein coupling to the GABA-B receptor in the nucleus accumbens and the medial prefrontal cortex of the rat after chronic treatment with nicotine. *Neuroscience letters*. 2004; 355: 161-164.
- Amaral DG, Kurz J. The time of origin of cells demonstrating glutamic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the rat hippocampal formation of the rat. *Neuroscience letter* 1985; 59:33-39
- Amari S. et al. Neuroinformatics: the integration of shared databases and tools toward integrative neuroscience. *J. Integr Neuroscience*. 2002 Dec; 1(2): 117-28.
- Anderson JD. Perez-Carballo J. The nature of indexing: how humans and machines analyze messages and texts for retrieval. Part I: Research, and the nature of human indexing. *Information processing and management*. 2001; 37 : 231-254.
- Anderson TR, Sahah PA, Benson DL. Maturation of glutamatergic and GABAergic synapse composition in hippocampal neurons. *Neuropharmacology*. 2004Oct; 47(5):694-705.
- Antonopoulus J, Pappas IS, Parnavelas JG. Activation of the GABA-A receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. *European Journal of Neuroscience*. 1997; 9: 291-298.
- Aoki E, Semba R, Kashiwamata S. When does GABA-like immunoreactivity appear in the rat cerebellar GABAergic neurons? *Brain research* 1989; 502(2):245-51.

- Araki T, Kiyama H, Tohyama M. GABA-A receptor subunit Messenger RNAs show differential expresión during cortical development in the rat brain. *Neuroscience* 1992; 51 (3) : 583-91.
- Asanuma C, Porter LL. Light and electron microscopic evidence for a gabaergic projection from the caudal basal forebrain to the thalamic reticular nucleus in rats. *The Journal of comparative neurology*. 1990; 302:159-173.
- Attwood TK, Miller CJ. Progress in bioinformatics and the importance of being earnest. *Biochechnology annual rview* 2002; 8 : 1-54.
- Awatramani GB, Turecek R, Trussell LO. Staggered development of gabaergic and glycinergic transmisión in the MNTB. *J.neurophysiol*. 2005 Feb; 93(2):819-28.
- Azimi-Zonooz A, Shuttleworth CW, Connor JA. GABAergic protection of hippocampal pyramidal neurons against glutamate insult déficit in young animals compared with adults. *J Neurophysiol*. 2006 Jul ; 96(1):299-308.
- Baccei ML, Fitzgerald M. Development of GABAergic and glycinergic transmisión in neornatal rat dorsal horn. *J.neurosci*. 2004 May; 24(20): 4749-57.
- Balcar VJ, Dammasch I, Wolff JR. Is there a non-synaptic component in the K⁺-stimulated release of GABA in the developing rat cortex?. *Brain res*. 1983; 312(2):309-11.
- Balcar VJ, Zetsche T, Wolff JR. Glutamate decarboxylase in developing rat neocortex: does it correlate with the differentiation of Gabaergic neurons and synapsis?. *Neurochemical research*. 1992 Mar; 17 (3):253-60.
- Barber RP, Vaughn JE, Roberts E. The cytoarchitecture of gabaergic neurons in rat spinal cord. *Brain Research*. 1982; 238: 305-328.
- Bargas J, Galárraga E. La acción neuromoduladora de la dopamina sobre los ganglios basales.
<http://sunsite.dcc.uchile.cl/nuevo/ciencia/cienciaAIDia/volumen3/numero2articulo6.html>.

- Barnard EA, Darlison MG, Seeburg P. Molecular biology of the GABA-A receptor. The receptor/channel superfamily. Trends Neurosci. 1987; 10: 502-509.
- Bates TE, Williams SR, Gaidant DG, Bell JD, Small RK, Iles RA. ¹H NMR Study of cerebral development in the rat. NMR in Biomedicine 1989; 2, (5-6): 225-229.
- Bayer SA, Altman J. Development of the preoptic area: time and site of origin, migratory routes and settling patterns of its neurons. The Journal of comparative neurology. 1987 Nov; 265(1):65-95.
- Bayer SA, Altman J. Development of the endopiriform nucleus and the claustrum in the rat brain. Neurosci. 1991; 45(2): 391-412.
- Bayer SA, Altman J, Ruso RJ, Dai XF, Simmons JA. Cell migration in the rat embryonic neocortex. J Comp Neurol. 1991 May; 307(3): 499-516.
- Bayer SA, Zhang X, Russo RJ, Altman J. Three-dimensional reconstructions of the developing forebrain in rat embryos. NeuroImage 1994; 1 (4) : 296-307.
- Bayer SA, Altman J. Insights regarding the links between deep nuclear and Purkinje cell migrations, the development of cerebellar lobules, and cerebellar circuitry. Neurotoxicology and Teratology. 1998 May; 20(3) : 352.
- Beaumont A, Houdry J, Vernier JM, Wegnez M. Development. Paris, Dunod; 1994.
- Behar T, Schaffner AE, Barker JL. Immunocytochemical analysis of GAD expression in cells of the developing rat spinal cord. Journal of cell biology 1990; 11: 1361.
- Behar T, Schaffner A, Laing P, Hudson L, Komoly S, Barker JL. Many spinal cord cells transiently express low molecular weight forms of glutamic acid decarboxylase during embryonic development. Brain research. Developmental brain research 1993 Apr; 72(2) : 203-18.
- Behar T, Ma W, Hudson L, Barker J. Analysis of the anatomical distribution of GAD 67 mRNA encoding truncated glutamic acid

- decarboxylase proteins in the embryonic rat brain. *Devopmental brain research*. 1994; 77: 77-87.
- Behar TN, Schaffner AE, Colton CA, Somogy R, Olah Z, Lehel C, Barker JL. GABA-induced chemokinesis and NGF-induced chemotaxis of embryonic spinal cord neurons. *Journal of neuroscience* 1994 Jan; 14(1): 29-38.
 - Behar TN, Schaffner AE, Tran HT, Barker JL. GABA-induced motility of spinal neuroblast develops along a ventrodorsal gradient and can be mimicked by agonist of GABA-A and GABA-B receptors. *Journal of neuroscience research*. 1995; 42: 97-108.
 - Behar TN, L Y-X, Ma W, Dunlap V, Scott C, Barker JL. GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J neurosci*. 1996 March; 16(5): 1808-1818.
 - Behar TN, Smith SV, Kennedy RT, McKenzie JM, Maric I, Barker JL. GABA-B receptors mediate motility signals for migrating embryonic cortical cells. *Cerebral cortex*. 2001; 11(8): 744-53.
 - Becker S. A computational principle for hippocampal learning and neurogenesis. *Hippocampus*. 2005; 15(6):722-38.
 - Beleboni RO, Guizzo R, Fontana AC, Pizzo AB, Carolino RO, Gobbo-Neto L, Lopes NP, Netto JC, Santos WF. Neurochemical characterization of a neuroprotective compound from *Parawixia bistriata* spider venos that inhibits synaptosomal uptake of GABA and glycine. *Mol Pharmacol*. 2006 March. Epub ahead of print.
 - Bellion A, Metin C. Early regionlisation of the neocortex and the medial ganglionic eminence. *Brain Res Bull*. 2005 Sep; 66(4-6):402-9.
 - Ben-Ari Y. et al GABAergic mechanisms in the CA3 hippocampal region during early postnatal life. *Prog-Brain-Res*. 1990; 83: 313-21.
 - Ben-Ari Y. Excitatory actions of GABA during development: the nature of nurture. *Nature Rev. Neurosci*. 2002 Sep; 3(9):728-739.
 - Ben-Ari Y, Khalilov I, Represa A, Gozlan H. Interneurons set the tune of developing networks. *Trends Neurosci*. 2004 Jul; 27(7):422-7.

- Ben-Ari Y, Holmes GL. The multiple facets of gamma-aminobutyric acid dysfunction in epilepsy. *Curr Opin Neurol*. 2005 Apr; 18(2):141-5.
- Benson DL, Watkins FH, Steward O, Banker G. Characterization of GABAergic neurons in hippocampal cell cultures. *J. Neurocytol*. 1994 May; 23(5): 279-95.
- Berbel P. Las hormonas de la inteligencia. *Investigación y Ciencia: Mente y Cerebro*. 2003; 2: 10-20.
- Berninger B, Marty S, Zafra F, da-Penha-Berrzaghi M, Thoenen H, Lindholm D. GABAergic stimulation switches from enhancing to repressing BDNF expresión in rat hippocampal neurons during maturation in vitro. *Development* 1995 Aug; 121(8): 2327-35.
- Betarbet R, Zigova T, Bakay RA, Luskin MB. Dopaminergic and GABAergic interneurons of the olfactory bulb are derived from neonatal subventricular zone. *Int Dev Neurosci*. 1996 Nov; 14(7-8):921-30.
- Bianchi MS, Lux-Lantos VA, Bettler B, Libertun C. Expresión of gamma-aminobutyric acid B receptor subunits in the hypothalamus of males and female developing rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 2005 Dec; 160(2): 124-9.
- Blaesse P, Guillemín I, Schindler J, Schweizer M, Delpire E, Khiroug L, Friauf E, Nothwang HG. Oligomerization of KCC2 correlates with development of inhibitory neurotransmission. *J Neurosci*. 2006 Oct; 26(41); 10407-19.
- Blakemore C. Introduccion: mysteries in the making of the cerebral cortex. *Development of the cerebral cortex. Ciba Foundation Symposium John Welwy & so*. 1995
- Bloom FE. Publishing (whatever that means) neuroscience in the new millenium. *Brain research*. 2000; 886 ; 1-4.
- Boue-Grabot E, Roudbaraki M, Bascles L, Tramu G, Bloch B, Garret M. Expresión of GABA receptor rho subunits in rat brain. *J Neurochem*. 1998 Mar; 70(3):899-907.

- Bowery NG, Hill DR, Hudson AL. Characteristics of GABA-B receptor binding sites on rat whole brain synaptic membranes. *Br.J.Pharmac.* 1983; 78: 191-206.
- Bowery NG, Hudson AL, Prince GW. GABA-A and GABA-B receptor site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1987; 20: 365-383.
- Bragin A, Takacs J, Vinogradova O, Hamori J. Quantitative estimation of the ratio of GABA-immunoreactive cells in neocortical grafos. *J Neural Transplnt Plas.* 1991; 2(3-4): 235-42.
- Brickley SG et al Development of a tonic form of synaptic inhibition in rat cerebellar granule cells resulting from persistent activation of GABA-A receptors. *Journal Physiol.* 1996; 497(3): 753-9.
- Brown M. et al. Changes in GABA-immunoreactivity during development of the rostral subdivision of the nucleus of the solitary tract. *Neuroscience* 2000; 100(4):849-59.
- Brown M, Keynes R, Lumdsen A. *The developing brain.* Oxford, Oxford University Press; 2001.
- Brown A. *Nerve cells and nervous systems. An introduction to neuroscience.* London. Springer-Verlag; 1991.
- Butler AB, Hodos W. *Comparative Vertebrate Neuroanatomy. Evolution and Adaptation.* 1st ed. New York: Wiley-Liss, Inc; 1996.
- Cairns-Smith AG. *La evolución de la mente. Sobre la naturaleza de la materia y el origen de la conciencia.* Madrid. Cambridge University Press; 2000.
- Cajal SR. *Histología de sistema nervioso. Capítulo XIX: Histogénesis del cerebelo.* Alicante: Instituto de Neurociencias Universidad de Alicante; 1992.
- Cajal SR. *Histologia de sistema nervioso. Capítulo XLVII: Histogenesis de la corteza cerebral.* Instituto de Neurociencias Universidad de Alicante. 1992.

- Canepari M, Mammano F, Kachalsky SG, Rahamimoff R, Cherubini E. GABA and glutamate-mediated network activity in the hippocampus of neonatal and juveniles rats revealed by fast calcium imaging. *Cell-Calcium*. 2000; 7(1): 25-33.
- Carlson NR. Fisiología de la Conducta. Traducción de la 6ª ed en ingles. Barcelona. Ariel Neurociencia; Oct. 1999.
- Carpenter MK, Parker I, Miledi R. Expresión of GABA and glycine receptors by Messenger RNAs from the developing rat cerebral cortex. *Proceedings of the royal society of London* 1988; 234(1275): 159-70.
- Castillo, Hoffman, Martinez, Mamasini. Embriología. Biología del desarrollo. México, Masson Doyma; 2002.
- Clayton GH, Owens GC, Wolf JS, Smith RL. Ontogeny of cation-Cl⁻ cotransporter expresión in rat neocortex. *Dev brain res*. 1998; 109(2): 281-92.
- Cobas A, Fairen A, Alvarez-Bolado G, Sanchez MP. Transient GABA-like immunoreactive axons in the corpuscallosum of perinatal rats. *Neurosci-Lett*. 1988; 93(1):7-12.
- Cobas A, Fairen A, Alvarez-Bolado G, Sanchez MP. Prenatal development of the intrinsic neurons of the rat neocortex: a comparative study of the distribution of GABA-immunoreactive cells and the GABA-A receptor. *Neuroscience* 1991; 40(2): 375-97.
- Cohen A.S. et all. Protrated postnatal development of inhibitory synaptic transmission in rat hippocampal area CA1 neurons. *Journal of Neurophysiol*. 2000; 84(5)2465-76.
- Colin-LeBrun I, Ferrand N, Caillard O, Tosetti P, Ben-Ari Y, Gaiarsa JL. Spontaneous synaptic activity is required for formation of functional GABAergic synapses in the developing rat hippocampus. *J. physiol*. 2004 Aug; 559(1): 129-139.
- Cordero-Erausquin M, Coull JA, Boudreau D, Rolland M, De Koninck Y. Differential maturation of GABA actino and anion reversal potencial in

- spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J Neurosci*. 2005 Oct; 25(42):9613-23.
- Cordon García JA. López Lucas J. Vaquero Pulido J.R. Manual de investigación bibliográfica y documental. Teoría y práctica. Ediciones Pirámide. Grupo Anaya S.A.Madrid. 2001.
 - Cotman CW. Editor. Synaptic plasticity. New York, The Gilford Press; 1985.
 - Cowan W, Jessell T, Zipursky S. Molecular and cellular approaches to neural development. Oxford, Oxford University Press; 1997.
 - Coyle JT, Enna SJ. Neurochemical aspects of the ontogenesis of GABAergic neurons in the rat brain. *Brain research* 1976; 111(1):119-33.
 - Curtis DR, Duggan AW, Felix D, Johnston GA, McLennan H. Antagonism between bicuculline and GABA in the cat brain. *Brain Res*. 1971; 33: 57-73.
 - Chan CY, Gibas TT, Borden LA, Farb DH. Multiple embryonic benzodiazepine binding sites: evidence for functionality. *Life Sci*. 1983 Nov; 33(21):2061-9.
 - Chang EF, Bao S, Imaizumi K, Schreiner CE, Merzenich MM. Development of spectral and temporal response selectivity in the auditory cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005 Nov; 102(45): 16460-5. Epub.
 - Chao TC, Chen CM. Learning-induced synchronization and plasticity of a developing neural network. *J. Comput. Neurosci*. 2005 Dec; 19(3):311-24.
 - Chechik G, Meilijson I, Ruppin E. Effective neuronal learning with ineffective Hebbian learning rules. *Neural Comput*. 2001 April; 13(4): 817-40.
 - Chelujá MG, Scolari MJ, Coelho TM, Blake MG, Boccia MM, Baratti CM, Acosta GB. L-serine and GABA uptake by synaptosomes during postnatal development of rat. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2006 Feb: Epub ahead of print.

- Chen G, Trombley PQ, Van den Pol A. GABA receptors precede glutamate receptors in hypothalamic development; differential regulation by astrocytes. *Journal of Neurophysiology* 1985; 74(4): 1473-1484.
- Chen G, Trombley PQ, Van del Pol AN. Excitatory actions of GABA in developing rat hypothalamic neurones. *J physiol.* 1996 Jul; 494 (2): 451-64.
- Cherubini E, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y. GABA: and excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends in neuroscience* 1991; 14(12): 515-519.
- Chowdhury GM, Patell AB, Mason GF, Rothman DI, Behar KL. Glutamatergic and GABAergic neurotransmitter cycling and energy metabolism in rat cerebral cortex during postnatal development. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 2007; Epub ahead of print.
- Christensen H, Fonnum F. The ontogeny of the uptake systems for glutamate, GABA and glycine in synaptic vesicles isolated from rat brain. *Neurochem res.* 1992 May; 17(5): 457-62.
- Chronwall B, Wolf JR. Prenatal and postnatal development of GABA-accumulating cells in the occipital neocortex of rat. *Journal of comparative neurology.* 1980; 190(1): 187-208.
- Chudotvorova I, Ivanov A, Rama S, Hubner CA, Pellegrino C, Ben-Ari Y, Medina I. Early expresión of KCC2 in rat hippocampal cultures augments expresión of functional synapses. *J.Physiol.* 2005 Aug; 566(3): 671-9.
- Damasio A. En busca de Spinoza. *Neurobiología de la emoción y los sentimientos.* Traducción de ed. inglesa de 2003. Barcelona. Ed. Critica S.L; 2005.
- Dames W, Joo F, Free O, Toldo J, Wolff JR. γ -aminobutyric acid enables synaptogenesis in the intact superior cervical ganglion of the adult rat. *Neuroscience letters.* 1985; 54: 159-164.
- Dammerman RS, Flint AC, Noctor S, Kriegstein AR. An excitatory GABAergic plexus in developing neocortical layer 1. *J Neurophysiol.* 2000; 84(1): 428-34.

- Dashti A.E. Ghandeharizadeh S. Stone J. Swanson L.W. Thompson R.H. Database challenges and solutions in neuroscientific applications. *Neuroimage* 1997; 5 : 97-115.
- Davis AM, Grattan DR, Selmanoff M, McCarthy MM. Sex differences in glutamic acid decarboxylase mRNA in neonatal rat brain: implications for sexual differentiation. *Hormones and behavior* 1996; 30(4):538-52.
- Davis AM, Pensuchuck S, Fritschy JM, McCarthy MM. Developmental switch in the expression of GABA-A receptor subunits alpha(1) and alpha(2) in the hypothalamus and limbic system of the rat. *Brain-Res-Dev-Brain-Res.* 2000 Jan; 119(1): 127-28.
- Davis AM, Grattan DR, McCarthy MM. Decreasing GAD neonatally attenuates steroid-induced sexual differentiation of the rat brain. *Behavioral neuroscience.* 2000; 114(5):923-33.
- Decavel C, Van del Pol A. GABA: A dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *The Journal of comparative neurology.* 1990; 302: 1019-1037.
- De Biasi S, Frassoni C, Spreafico R. GABA immunoreactivity in the thalamic reticular nucleus of the rat. A light and electron microscopical study. *Brain research.* 1986; 399: 143-147.
- De Biasi S, Amadeo A, Arcelli P, Frassoni C, Spreafico R. Postnatal development of GABA-immunoreactive terminals in the reticular and ventrobasal nuclei of the rat thalamus: a light and electron microscopy study. *Neuroscience* 1997; 76, (2): 5003-516.
- De Felipe J. El cerebro en el espacio. *Mente y Cerebro. Investigación y Ciencia.* 2002; 1: 72-81.
- DeGois S, Schafer MK, Defamie N, Chen C, Ricci A, Weihe E, Varoqui H, Erickson JD. Homeostatic scaling of vesicular glutamate and GABA transporter expression in rat neocortical circuits. *J. Neurosci.* 2005 Aug; 25(31):7121-33.

- De Lima AD, Voigt T. Identification of two distinct populations of gamma-aminobutyric acidergic neurons in cultures of the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 1999 Dec; 388(4): 526-40.
- De Lima AD, Opitz T, Voigt T. Irreversible loss of subpopulation of cortical interneurons in the absence of glutamatergic network activity. *Eur. Journal neuroscience*. 2004 Jun; 19(11): 2931-43.
- De Lima AD, Lima BD, Voigt T. Earliest spontaneous activity differentially regulates neocortical GABAergic interneuron subpopulations. *Eur. J. Neurosci* 2007; 25(1):1-16.
- Dent G, Choi DC, Herman JP, Levine S. GABAergic circuits and the stress hyporesponsive period in the rat: ontogeny of glutamic acid decarboxylase (GAD) 67 mRNA expression in limbic-hypothalamic stress pathway. *Brain Res*. 2007;1 138: 1-9.
- Diamond MC. Enriching heredity. The impact of the environment on the anatomy of the brain. New York, The Free Press; 1988.
- Didelon F, Mladinic M, Cherubini E, Bradbury A. Early expression of GABA-A receptor delta subunit in neonatal rat hippocampus. *J neurosci*. 2000; 22 (5) : 638 – 43.
- D'Inverno M, Howells P, Hu M, Luck M. Soft-link hypertext for information retrieval. *Information and software technology*. 2002; 44: 101-112.
- Duffy FH, Burchfiel JL, Mower GD, Joy RM, Snodgrass SR. Comparative pharmacological effects on visual cortical neurons in monocular deprived cats. *Brain res*. 1985 Jul; 339(2): 257-64.
- Dupuy ST, Houser CR. Early appearance and generation of a prominent population of GAD67-containing neurons in the developing rat hippocampal formation. *Soc Neuroscience Abstract* 1995; 21:307.
- Dupuy ST, Houser CR. Prominent expression of two forms of glutamate decarboxylase in the embryonic and early rat hippocampal formation. *The journal of neuroscience* 1996; 16(21): 6919-6932.

- Dupuy ST, Houser CR. Developmental changes in GABA neurons of the rat dentate gyrus: an in situ hybridization and birthdating study. *The Journal of comparative neurology* 1997; 389 (3):402-18.
- Dupuy DS, Houser CR. Evidence for changing positions of GABA neurons in the developing rat dentate gyrus. *Hippocampus* 1999; 9(2):186-99.
- Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, Benke TA, Delpire E, Jensen, Staley KJ. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med.* 2005; 11(11): 1205-13.
- EBSCO Host Research Database Medline. Guía de consulta UCM Biblioteca Complutense Julio 2004.
- Elliot T. An analysis of synaptic normalization in a general class of Hebbian models. *Neural Comput.* 2003 Apr; 15(4): 937-63.
- *emap edinburgh mouse atlas project*. Disponible en: <http://genex.hgu.mrc.ac.uk/>
- Escudero S. Photoshop 6 para Windows y Mac os. Curso de iniciación. Barcelona, Inforbooks, S.L.; 2001.
- Esposito MS, Piatti VC, Laplagne DA, Morgenstern NA, Ferrari CC, Pitossi FJ, Schinder AF. Neuronal differentiation in the adult hippocampus recapitulates embryonic development. *J Neurosci.* 2005 Nov; 25(44):10074-86.
- Fairen A, Cobas A, Fonseca M. Times of generation of glutamic acid decarboxylase immunoreactive neurons in mouse somatosensory cortex. *J comp neurol.* 1986; 251:67-83.
- Feleder C, Ginzburg M, Wuttke W, Moguilevsky JA, Arias P. Gabaergic activation inhibits the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and sexual development in the immature female rat. Associated changes in hypothalamic glutamatergic and taurinergic systems. *Dev brain res* 1999; 116 (2): 151-7.
- Fiori S. Non linear complex-valued extensions of Hebbian learning: an essay. *Neural Comput.* 2005 Apr; 17(4): 779-838.

- Firth SI, S  ller MB. Dissociated GABBAergic retinal interneurons exhibit spontaneous increase in intracellular calcium. *Vis Neurosci*. 2006 Sept-Oct; 23(5):807-14.
- Fiszman ML, Behar T, Lange GD, Smith SV, Novotny EA, Barker JL. GABAergic cells and signals appear together in the early post-mitotic period of telencephalic and striatal development. *Brain research. Developmental brain research* 1993; 73(2) : 243-51.
- Fitzgerald M. Koltzenburg M. The functional development of descending inhibitory pathway in the dorsolateral funiculus of the newborn rat spinal cord. *Dev. Brain Res*. 1986; 24: 261-270.
- Flames N, Marin O. Developmental mechanisms underlying the generation of cortical interneuron diversity. *Neuron*. 2005 May; 46(3):377-81.
- Fletcher EL, Kalloniatis M. Localization of amino acids neurotransmitters during postnatal development of the rat retina. *Journal of comparative neurology* 1997; 380(4): 449-71.
- Florian CL, Williams SR, Bhakoo KK, Noble MD. Regional and developmental variations in metabolite concentration in the rat brain and eye: A study using ¹H-NMR spectroscopy and high performance liquid chromatography. *Neurochemical research*. 1996; 21(9): 1065-1074.
- Fodor JA. La modularidad de la mente. Trad: JM. Igoa. Madrid: Editorial Morata S.A.; 1986
- Fonseca M, Soriano E. Calretinin-immunoreactive neurons in the normal human temporal cortex and Alzheimer's disease. *Brain research*. 1995; 691: 83-91.
- Foster GA. *Chemical Neuroanatomy of the Prenatal Rat Brain. A developmental atlas*. Oxford University Press. Oxford. 1998.
- Frahm C, Draguhn A. GAD and GABA transporter (GAT-1) mRNA expression in the developing rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res*. 2001; 132(1):1-13.

- Fritschy JM, Paysan J, Enna A, Moler H. Switch in the expresión of the rat GABA-A receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J neurosci.* 1994; 14 (9): 5302-24.
- Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Mohler H. GABA-B receptor splice variansts GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci.* 1999 Mar; 11(3):761-8.
- Fuentes X, Castiñeiras MJ,. *Diccionario de ciencias de laboratorio clínico.* Madrid, McGraw-Hill Interamericana; 1998.
- Fukura H, Komiya Y, Igarashi M. Signaling pathway downstream of GABA-A receptor in the growth cone. *Journal of neurochemistry* 1996; 67: 1426-1434.
- GABA y neurotransmisión gabaérgica.
<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Ciencias/neuroquimica/libros/neurobioquimica/GABA.html>.
- Gaiarsa JL, McLean H, Congar P, Leinekugel X, Khazipov R, Tseeb V, Ben-Ari Y. Postnatal maturation of gamma-aminobutyric acid A and B –mediated inhibition in the CA3 hippocampal region of the rat. *J neurobiol.* 1995 Mar; 26(3): 339-49.
- Gaiarsa JL. Plasticity of gabaergic synapses in the neonatal rat hippocampus. *Neuroscience review series. J. cell. mol. med.* 2004; 8(1): 31-37.
- Gallager DW, Kehne JH, Wakeman EA, Davis M. Developmental changes in pharmacological responsivity of the acoustic startle reflex: effects of picrotoxin. *Psychopharmacology.* 1983; 79(2-3): 87-93.
- Gambarana C, Beattie CE, Rodríguez ZR, Siegel RE. Region-specific expresión of Messenger RNAs encoding GABA-A receptor subunits in the developing rat brain. *Neuroscience.* 1991; 45(2): 423-32.
- Ganguly K, Schinder AF, Wong ST, Poo M. GABA itself promotes the developmental switch of neuronal GABAergic response from excitation to inhibition. *Cell* 2001 May; 105(4): 521-32.

- Gao BX, Ziskind-Conhaim L. Developmet of glycine and GABA-gated currents in rat spinal cord motoneurons. The journal of neurophysiology 1995; 74(1):113-21.
- Gao BX, Stricker C, Ziskind-Conhaim L. Transition from GABAergic to glycinergic synaptic transmission in newly formed spinal networks. J Neurophysiol. 2001 Jul; 86(1): 492-502.
- Garcia-Linares A. Informatica y atlas cerebrales. Informática y salud 2000 ; 27. Disponible: http://www.conganat.org/seis/i_s/is27/i_s27f.htm
- Garrett KM, Duman RS, Saito N, Blume AJ, Vitek MP, Tallman JF. Isolation of a cDNA clone for the alpha subunit of the uman GABA-A receptor. Biochemical and biophysical research communications 1988; 156(2): 1039-45.
- Gibbs JW 3rd, Schroder GB, Coulter DA. GABA-A receptor function in developing rat thalamic reticular neurons: whole cell recordings of GABA-mediated currents and modulation by clonazepam. J neurophysiol. 1996; 76(4) : 2568-79.
- Gilbert SF. Developmental Biology. ed 6ª. Sinauer Associates Inc, Publishers. New York. 2000.
- Gillespie DC, Kim G, Kandler K. Inhibitory synapses in the developing auditory system are glutamatergic. Nat neurosci. 2005 Mar; 8 (3): 332-8.
- Golleman D. Inteligencia Emocional. 9ª ed. Barcelona: Ed Kairós; 1996.
- Gomez-Lira G, Lamas M, Romo-Parra H, Gutierrez L. Programmed and induced phenotype of hippocampal granule cells. J neurosci. 2005 Jul; 25(30):6939-46.
- Goodman GA, Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Las bases farmacológicas de la terapéutica Vol 1. 9ª ed. México: McGraw-Hill, Interamericana Editores S.A.; 1996.
- Gotz M, Williams BP, Bolz J, Price J. The specification of neural fate: a common precursor for neurotransmitter subtype in the rat cerebral cortex in vitro. Euro J neurosci. 1995 May; 7(5):889-98.

- Götz M. Getting there and being there in the cerebral cortex. Experientia, Birkhäuser Verlag, Basel – Switzerland. Vol 51 pp: 301-316. 1995.
- Gordienko EA, Zhubrikova LA. Ontogenetic differences of glutamate decarboxylase, GABA aminotransferase, monoamina oxidase activities of cerebral cortex mitochondria and hypothalamic cerebral area. Ukr-Bikhim-Zh. Traducción inglesa del Medline. 1980; 52(4):423-8.
- Gordon E, editor. Integrative neuroscience. Bringing together biological, psychological and clinical models of the human brain. Amsterdam, Overseas Publishers Association; 2000.
- Gotow T. et al Postnatal development of the inferior olivary complex in the rat: Synaptogenesis of GABAergic afferents, analyzed by glutamic acid decarboxylase immunocytochemistry. J Comp. Neurol. 1987; 263(4):526-52.
- Gotz M, Bolz J. Differentiation of transmitter phenotypes in rat cerebral cortex. Eur J neurosci. 1994; 6(1): 18-32.
- Gras C, Vinatier J, Amilhon B, Guerci A, Christov C, Ravassard P, Giros B, El Mestikawy S. Developmentally regulated expression of VGLUT3 during early postnatal life. Neuropharmacology. 2005 Nov; 49(6): 901-11. Epub.
- Greif KF, Tillakaratne NJ, Erlander MG, Feldblum S, Tobin AJ. Transient increase in expression of glutamate decarboxylase (GAD) mRNA during the postnatal development of the rat striatum. Developmental Biology. 1992 Sep; 153(1):158-64.
- Greif KF. et al. Postnatal expression of glutamate decarboxylases in developing rat cerebellum. Neurochem-Res. 1994; 16(3): 235 - 42.
- Grobin A, Heenan E, Lieberman J, Morrow A. Perinatal neurosteroid levels influence gabaergic interneuron localization in adult rat prefrontal cortex. J neurosci. 2003 Mar; 23(5): 1832-1839.
- Gruol DL. Cultured cerebellar neurons: endogenous and exogenous components of Purkinje cells activity and membrane response to putative transmitters. Brain Res 1983 Mar; 263(2):223-41.

- Guerrero VP, De Moya F, Herrero V. Document organization using Kohonen's algorithm. *Information processing and management*. 2002; 38: 79-89.
- Guin C, Bottiglieri T, Carter O. GABA, γ -hydroxybutiric acid and neurological disease. *Ann Neurol* 2003; 54(6):3-12.
- Guyton AC. Anatomía y fisiología del Sistema Nervioso. 2ª ed. México: Neurociencia Básica. Editorial Medica Panamericana; 1994.
- Hahm ET, Lee JJ, Min BI, Cho YW. Developmental change of GABAergic postsynaptic current in rat periaqueductal gray. *Neurosci Lett*. 2005 May; 380(1-2):1877-92.
- Hammond C. *Cellular and Molecular Neurobiology*. 1st ed. New York: Academic Press; 2001.
- Harrison NL, Lange GD, Barker JL. (-)Baclofen activates presynaptic GABA-B receptors and GABAergic inhibitory neurons from embryonic rat hippocampus. *Neurosci Lett*. 1988 Feb; 85(1): 105-9.
- Harkness T, Maxwell RL. The future of cataloging: insights from Lubetzky symposium. *American Library Association*. 2000. Reseña del libro en: *The journal of academic librarianship*; 236-237.
- Hathway G, Harrop E, Baccei M, Walker S, Moss A, Fitzgerald M. A postnatal switch in GABAergic control of spinal cutaneous reflexes. *Eur. J. Neurosci*. 2006 Jan; 23(1): 112-8.
- Heck D, Sultan F. El cerebelo. *Investigacion y ciencia* 2002; 6-14.
- Hedner T, Iversen K, Lunndborg P. Central GABA mechanisms during postnatal development in the rat: Neurochemical Characteristics. *Journal of neural transmission* 1984;59(2):105-18.
- Heinamaki AA, Lindfors AS. Free aminoacids in rat ocular tissues during postnatal development. *Biochemistry international* 1988; 16(3):405.
- Henneberger C, Jutter R, Schmitd SA, Walter J, Meier JC, Rothe T, Grantyn R. Glu-R and TrkB-mediated maturation of GABA receptor

- function during the perior of eye opening. *Eur J Neurosci.* 2005 Jan; 21(2):431-40.
- Herber R, Stromberg M. *Anatomy and Embriology of the laboratory rat.* 1st ed. Verlag: BioMed; 1986.
 - Hernadez-Tristan R, Leret ML, Almeida D. Effect of intrauterine position on sex differences in gabaergic system and behavior of rats. *Physiol. Beha.* 2006 Mar; 87(3):625-33.
 - Hevers W, Luddens H. Pharmacological heterogeneity of gamma-aminobutyric acid receptors during development suggest distict classes of rat cerebellar granule cells in situ. *Neuropharmacol.* 2002; 42(1) : 34-47.
 - High resolution mouse brain atlas. Disponible en: <http://www.hms.harvard.edu/research/brain/atlas.html>
 - Horvath AR. Pewsner D. Systematic reviews in laboratory medicine: pinciples, proceses and practical considetations. *Clinica Chimica Acta.* 2004; 342 : 23-39.
 - Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, Bito H, Terashima T, Wright CV, Kawaguchi Y, Nako K, Nabeshima Y. Ptfa, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron.* 2005 Jul; 47(2):201-13.
 - Houser CR, Vaughn JE, Barber RP, Roberts E. GABA neuros are the major cell type of the nucleus reticularis thalami. *Brain res.* 1980; 200: 341-354.
 - <http://www.apple.com>
 - <http://www.lvma.org/rat.html>.
 - <http://www.library.uq.edu.au/training/citacion/vancouv.html>
 - <http://www.ratbehavior.org/rats.html>.
 - <http://www.uac.arizona.edu//notes/classes/rodentbio/rodentbio.html>.

- Huttenlocher PR. Neural plasticity. The effects of environment on the development of the cerebral cortex. Harvard University Press. London 2002.
- Hynes RO, Patel R, Miller RH. Migration of neuroblast along preexisting axonal tracts during prenatal cerebellar development. The journal of neuroscience: The official journal of the society for neuroscience. 1986 Mar; 6(3):867-876.
- Ige AO, Bolam JP, Billinton A, White JH, Marshall FH, Emson PC. Cellular and sub-cellular localization of GABA-B1 and GABA-B2 receptor proteins in the rat cerebellum. Brain Res. Mol. Brain Res. 2000 Nov; 83 (1-2): 72-80.
- Illera M, Illera JC, Illera J. El ratón y la rata. Editorial Complutense. Madrid. 1991.
- Isaev D, Isaeva E, Khazipov R, Holmes GL. Shunting and hyperpolarizing GABAergic inhibition in the high-potassium model of ictogenesis in the developing rat hippocampus. Hippocampus 2007;17(3):210-9.
- Ishikawa A, Shiono T, Tshiguro S, Tamai M. Postnatal developmental expression of glutamine and related amino acids in the rat retina. Current eye research. 1996; 15(6):662-8.
- Issa NP. Inhibitory circuits in sensory maps develop through excitation. Trends Neurosci. 2003 Sep; 26(9): 456-458.
- Jackson MS. Beyond relational databases. Information and software technology. 1990; 32(4) : 258-265.
- Jacobs R. Goal-directed magnetic resonance brain micro-imaging. URL: <http://waggle.gg.caltech.edu/hbp/index.html>.
- Jankowska MA. Identifying University professors' need in challenging environment of information and communication technologies. The journal of academic librarianship. 2004; 30: 51 – 66.
- Jean-Xavier C, Pflieger JF, Liabeuf S, Vinay L. Inhibitory postsynaptic potentials in lumbar motoneurons remain depolarizing after neonatal

- spinal cord transection in the rat. *Neurophysiol.* 2006 Nov; 96(5): 2274-81.
- Ji F, Kanbara N, Obata K. GABA and histogenesis in fetal and neonatal mouse brain lacking both isoforms of glutamic acid decarboxylase. *Neurosci Res.* 1999 Mar; 33(3):187-94.
 - Jones A, Korpi ER, McKernan RM, Pelz R, Nusser Z, Mäkelä R, Mellor JR, Pollard S, Bahn S, Stephenson FA, Randall AD, Sieghart W, Somogyi P, Smith AJH, Wisden W. Ligand-gated Ion channel subunit partnerships: GABA-A receptor $\alpha 6$ subunit gene inactivation inhibits δ subunit expression. *J Neurosci.* 1997 Feb; 17(4):1350-1362.
 - Junghans TB. Sevin IF. Ionin B. Seifried H. Cancer information resources: digital and online sources. *Toxicology* 2004; 02.021.
 - Jussofie A. Steroid modulation of central nervous GABA-A receptor binding in three female rat brain areas during postnatal development. *Dev neurosci.* 1995; 17 (5-6) : 335-42.
 - Kalin NH. Neurobiología del miedo. *Investigación y Ciencia. Temas* 32. 2003; 64-71.
 - Kandel E, Schwartz JH, Jessell TM. *Principles in Neural Science.* 3º ed New York. Elsevier; 1991.
 - Kapur J. Role of GABA-A receptor-mediated inhibition in the patogénesis of generalized seizures. *Experimental neurology.* 2003; 184: 1-2.
 - Karten YJ, Jones MA, Jeurling SI, Cameren HA. GABAergic signaling in young granule cells in the rat and mouse dentate gyrus. *Hippocampus.* 2006; 16(3):312-20.
 - Kasyanov AM, Safiulina VF, Voronin LL, Cherubini E. GABA-mediated giant depolarizing potentials as coincidence detectors for enhancing synaptic efficacy in the developing hippocampus. *PNAS.* 2004 Mar; 101(11): 3967-3972.
 - Katoh-Semba R. et all. Age-dependent and selective binding of beta-bungarotoxin to GABAergic neurons in the rat cerebellum. *Neursci Lett.* 1987; 76(1): 32 - 6.

- Kelby S. Mac OS X. Trucos esenciales. Ediciones ANAYA Multimedia. Madrid. 2003.
- Kellogg CK, Pleger GL. GABA-stimulated uptake and enhancement by diazepam in synaptoneurosomes from rat brain during prenatal and postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res*. 1989; 49(1):87-95.
- Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL. Developmental changes in gabaergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur. J neurosci*. 2004 Feb; 19(3): 590-600.
- Kikuchi K et al. Local image filing in neurosurgery: validity of selective storage of radiologic images. *J Exper Med*. 1991 Sep; 1-11.
- Kim G, Kandler K. Elimination and strengthening of glycinergic / GABAergic connections during tonotopic map formation. *Nat. neurosci*. 2003; 6: 282-290.
- Kim JH, Richardson R. A developmental dissociation of context and GABA effects on extinguished fear in rats. *Behav Neurosci*. 2007; 121(1):131-9.
- Kim MO, Li S, Park MS, Hornung JP. Early fetal expresión of GABA-B1 and GABA-B2 receptor mRNAs on the development of rat central nervous system. *Dev brain res*. 2003; 143(1): 47-55.
- Kimelberg H, Norenberg M. Astroцитos. *Investigación y Ciencia*. Jun 1989; 19-27.
- Kimura F, Baughman RW. GABAergic transcallosal neurons in developing rat neocortex. *Eur J neurosci*. 1997; 9 (6): 1137-43.
- Khazipov RN, Zefirov AL, Ben-Ari Y. GABA- the basic mediator of excitation in the early stages of hppocampal development. *Usp-Fiziol-Nauk*. 1998 Apr-Jun; 29(2): 55-67.
- Koller H, Siebler M, Schmalenbach C, Muller HW. GABA and glutamate receptors development of cultured neurons from rat hippocampus, septal region and neocortex. *Synapse*. 1990; 5 (1): 59-64.

- Kosaka K et al. Postnatal development of neurons containing both catecholaminergic and GABAergic traits in the rat main olfactory bulb. *Bain-Res.* 1987; 403(2): 355-60.
- Krisegstein AR, Suppes T, Prince DA. Cellular and synaptic physiology and epileptogenesis of developing rat neocortical neurons in vitro. *Brain research.* 1987 Aug; 431(2): 161-71.
- Kristt DA, Waldman JV. Late postnatal changes in rat somatosensory cortex. Temporal and spatial relationships of GABA-T and AchE. *Anatomy and Embriology* 1986; 174(1):115-22.
- Kuppers E, Sabolek M, Anders U, Pilgrim C, Beyer C. Developmental regulation of glutamic acid decarboxylase mRNA expression and splicing in the rat striatum by dopamine. *Molecular brain research.* 2000 Sep; 81(1-2):19-28.
- Kvale I. et al Development of neurotransmitter parameters in lateral geniculate body, superior colliculus and visual cortex of the albino rat. *Brain-Res.* 1983 ; 283(2-3) : 137-45.
- Lagercrantz H. Classical and "new" neurotransmitters during development- some examples from control of respiration. *Journal of developmental physiology* 1984; 6: 195-205.
- Lauder JM, Han VK, Henderson P, Verdoorn T, Towle AC. Prenatal ontogeny of the GABAergic system in the rat brain: an immunocytochemical study. *Neuroscience* 1986;19(2): 465-93.
- Laurie D, Widsen W, Seeburg PH. The distribution of thirteen GABA-A receptor subunit mRNAs in the rat brain III. Embryonic and postnatal development. *The journal of neuroscience* 1992; 12(11) : 4151-72.
- LeDoux JE. Emoción, memoria y cerebro. *Investigación y Ciencia. Temas* 28. 2002; 36-43.
- Legido A, Reichlin S, Dichter MA, Buchhalter J. Expression of somatostatin and GABA immunoreactivity in cultures of hippocampus. *Peptides.* 1990 Jan; 11(1):103-9.

- Leinekugel X, Khalilov I, McLean H, Caillard O, Gaiarsa JL, Ben-Ari Y, Khazipov R. GABA is the principal fast-acting excitatory transmitter in the neonatal brain. *Adv in neurol.* 1999; 79: 189-201.
- Lenz RA, Pilter TA, Alger BE. High intracellular Cl⁻ concentrations depress G-protein-modulated ionic conductances. *J neurosci.* 1997; 17(16) : 6133-41.
- Leret ML, Peinado V, Suarez LM, Tecedor L, Gamallo A, Gonzalez JC. Role of maternal adrenal glands on the developing serotonergic and aminocidergic systems of the postnatal rat brain. *International Journal of developmental neuroscience* 2004; 22 : 87-93.
- Li H, Tornberg J, Kaila K, Airaksinen MS, Rivera C. Patterns of cation-chloride cotransporter expresión during embrión rodent CNS development. *Eur J Neurosci.* 2002 Dec; 16(12):2358-70.
- Li S, Park MS, Kim MO. Prenatal alteration and distribution of the GABA(B1) an GABA(B2) receptor subunit mRNAs during rat central nervous system development. *Brain res.dev.brain res.* 2004 Jun; 150(2):141-50.
- Li SP, Kim JH, Park MS, Chung BC, Kim MO. Etanol modulates the expresión of GABA(B) receptor mRNAs in the prenatal rat brain in an age and area depent manner. *Neurosci.* Jul 2005. Epub ahead of print.
- Lim CH, Ho SM. GABAergic modulation of axonal conduction in the developing rat retinotectal pathway. *Brain Res Dev Brain Res.* 1998 Jun; 108(1-2):299-302.
- Lin SC, Bergles DE. Synaptic signaling between GABAergic interneurons and oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nat.neuroscience.* 2004 Jan; 7(1): 24-32.
- Lin Q, Wong-Riely MT. Postnatal developmental expresión of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei of rats. *Journal Appl. Physiology.* 2005Apr; 98(4): 1442-57.

- Liu J, Morrow AL, Devaud L, Grayson DR, Lauder JM. GABA-A receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *J neurosci.* 1997Apr; 17(7):2420-2428.
- Liu QY, Schaffner AE, Chang YH, Maric D, Barker JL. Persistent activation of GABA-A receptor / Cl⁻ channels by astrocytes derived GABA in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 2000 Sep; 84 (3): 1392-403.
- Liu Q, Wong-Rieley MT. Developmental changes in the expresión of GABA (A) receptor subunits alpha 1, alpha 2, and alpha 3 in the brain stem nuclei of the rats. *Brain Res.* 2006 Jul; 1098(1):129-38.
- Lohrke S, Srinivasan G, Oberhofer M, Doncheva E, Friauf E. Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine actions occurs at different perinatal ages in the superior olivary complex nuclei. *Eur J Neurosci.* 2005 Dic; 22(11): 2708-22
- Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Paulsen O, Fairen A, Lujan R. Expression and distribution of metabotropic GABA receptor subtypes GABABR1 and GABABR2 during rat neocortical development. *European Journal of Neuroscience.* 2002 Jun; 15(11):1766-78.
- Lopez-Bendito G, Lujan R, Shigemoto R, Ganter P, Paulsen O, Molnar Z. Blockade of GABA(B) receptors alters the tangential migration of cortical neurons. *Cereb Cortex.* 2003 Sep; 13(9): 932-42.
- Lopez-Bendito G, Shigemoto R, Kulik A, Vida A, Farién A, Lujan R. Distribution of metabotropic GABA receptor subunits GABA-B1a/b and GABA-B2 in the rat hippocampus during prenatal and postnatal development. *Hippocampus* 2004; 14(7): 836-48.
- Lo Turco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR. GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit síntesis. *Neuron.* 1995 Dec; 15(6): 1287-98.
- Lu J, Karadshed M, Delpire E. Developmental regulation of the neuronal-specific isoform K-Cl cotransporter KCC2 in postnatal rat brains. *J. Neurobiol.* 1999 Jun 15;39(4):558-68.

- Luhmann HJ, Prince DA. Transient expresión of polysynaptic NMDA receptor-mediated activity during neocortical development. *Neurosci. lett.* 1990 Mar; 111(1-2): 109-15.
- Luhmann HJ, Prince DA. Postnatal maturation of the gabaergic system in rat neocortex. *J neurophysiol.* 1991; 65 (2): 247-263.
- Lui J, Morrow AL, Devaud L, Grayson DR, Lauder JM. GABA-A receptors mediate trophic effects of GABA on embryonic brainstem monoamine neurons in vitro. *J Neurosci.* 1997; 2420-8.
- Lui Q, Wong-Riley MT. Postnatal developmental expressions of neurotransmitters and receptors in various brain stem nuclei. *J Appl Physiol.* 2005 Apr; 98(4):1442-57.
- Lujan R. Bases moleculares e la señalización neuronal. <http://www.ciencia.cl./cienciaAIDia/volumen5/numero2/articulos/ariculo5.html>.
- Lujan R, Shigemoto R. Localization of metabotropic GABA receptor GABAB1 and GABAB2 relative to synaptic sites in the rat developing cerebellum. *Eur. J. Neurosci.* 2006 Mar; 23(6): 1479-90.
- Luk KC, Sadikot AF. GABA promotes survival but no proliferation of parvalbumin-immunoreactive interneurons in rodent neostriatum: an vivo study with stereology. *Neuroscience* 2001; 104(1): 93-103.
- Luque JM, Malherbe P, Richards JG. Localization of GABA-A receptor subunits mRNA in the rat locus coeruleus. *Brain-Res-Mol-Brain-Res.* 1994 Jul; 24(1-4):219-26.
- Ma W, Behar T, Schaffner A, Smith S, Barker J. Parallel expression of GABA-A receptor and GABA in embryonic rat subcortical brain. *Society of neuroscience Abstrc* 1991; 17: 300. 2
- Ma W, Behar T, Barker J. Transient expression of GABA immunoreactivity in the developing rat spinal cord. *The Journal of comparative neurology.* 1992; 325:271-290.

- Ma W, Behar T, Maric D, Maric I, Barker JL. Neuroepithelial cells in the rat spinal cord express glutamate decarboxylase immunoreactivity in vivo and in vitro. *Journal of comparative neurology*. 1992 Aug; 325(2):257-70.
- Ma W, Saunders PA, Somogy R, Poulter MO, Barker JL. Ontogeny of GABA-A receptor subunit mRNA in rat spinal cord and dorsal root ganglia. *Journal of comparative neurology*. 1993; 338(3):337-59.
- Ma W, Behar T, Chang L, Barker JL. Transient increase in expression of GAD65 and GAD67 mRNAs during postnatal development of the rat spinal cord. *J comp neurol*. 1994 Aug; 346(1): 151-60.
- Ma W. Barker JL. GABA, GAD and GABA(A) receptor alpha 4 and gamma1 subunits are expressed in the late embryonic and early postnatal neocortical germinal matrix and coincide with gliogenesis. *Microsc Res Tech*. 1997 Mar; 40(5): 398-407.
- Maestría en neurociencia y biología del comportamiento 2005. Sección II. Características de los componentes celulares del tejido nervioso. Tema 6: Canales iónicos. Viguera Editores. Disponible en: info@viguera.com. 2005; 231-234
- Magoul R, Onteniente B, Geffard M, Calas A. Anatomical distribution and ultrastructural organization of the gabaergic system in the rat spinal cord. An immunocytochemical study using anti-GABA antibodies. *Neuroscience* 1987; 20(3): 1001-1009.
- Maingret F, Lauri SE, Taira T, Isaac JT. Profound regulation of neonatal CA1 rat hippocampal GABAergic transmission by functionally distinct kainate receptor populations. *J Physiol*. 2005 Aug; 567(1): 132-42 Epub.
- Majak K. et al. Parvalbumin immunoreactivity changes in the thalamic reticular nucleus during the maturation of the rat's brain. *Folia Neuropathol*. 1998; 36(1): 7-14.
- Manent JB, Jorquera I, Mazzucchelli I, Depaulis A, Perucca E, Ben-Ari Y, Represa A. Fetal exposure to GABA-acting antiepileptic drugs generates hippocampal and cortical dysplasias. *Epilepsia* 2007; 48(4):684-93.

- Mangan PS, Bertram EH. Ontogeny of altered synaptic function in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *Brain res.* 1998 Jul; 799(2): 183-96.
- Maran R. Computadoras. Guia Visual. 2^a ed. Trejos Hermanos Sucesores. S.A. Costa Rica. 1995.
- Marcum JW. From information center to discovery system: next step for libraries?. *The journal of academic librarianship* 2001; 27(2) : 97-106.
- Marchetti C, Pagnotta S, Donato R, Nistri A. Inhibition of spinal or hypoglossal motoneurons of the newborn rat by glycine or GABA. *Eur J neurosci.* 2002 Mar; 15(6): 975-83.
- Marenco L, Tosches N, Crasto C, Shepherd G, Miller PL, Nadkarni. Achieving evolvable Web-database bioscience applications using EAV/CR framework: recent advances. *J.Am.Med. Inform Assoc.* 2003 Sep-Oct; 10(5):444-53.
- Maric D. Maric I. Ma W. Lahoji F. Somogyi R. Wen X. Sieghart W. Fritschy J.M. Barker J.L. Anatomical gradients in proliferation and differentiation of embryonic rat CNS accessed by buoyant density fractionation: $\alpha 3, \beta 3$ and $\gamma 2$ GABA-A receptor subunit co-expression by post-mitotic neocortical neurons correlates directly with cell buoyancy. *Eur J Neurosci.* 1997;(9):507-522.
- Maric D, Liu QY, Maric I, Chaudry S, Chang YH, Smith SV, Sieghart W, Fritschy JM, Barker JL. GABA expression dominates neuronal lineage progression in the embryonic rat neocortex and facilitates neurite outgrowth via GABA-A autoreceptor/Cl⁻ channels. *J neurosci.* 2001; 21(7): 2343-60.
- Marti E. Gibson SJ. Polak JM. Facer P. Springall DR. Van Aswegen G. Aitchison M. Koltzenburg M. Falta el nombre del articulo. Desarrollo embrionario. *The Journal of comparative neurology.* 1997; 266: 332-359.
- Martín DL, Martín SB, Wu SJ, Espina N. Regulatory properties of brain decarboxylase (GAD): the apoenzyme of GAD is present principally as

- smaller of two molecular forms of GAD in brain. *J. Neurosci.* 1991; 11: 2725-2731.
- Martín SC, Steiger JL, Gravielle MC, Lyons HR, Russek SJ, Farb DH. Differential expresión of gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit mRNAs in the developing nervous system and receptor coupling to adenylyl cyclase in embryonic neurons. *The journal of comparative neurology.* 2004; 473 (1): 16-29.
 - Martina M. et all. Zinc modulation of bicuculline-sensitive and insensitive GABA receptors in the developing rat hippocampus. *Eur-Neuroscience.* 1996; 8(10): 2168-76.
 - Martín-Sanchez F et all. Synergy between medical informatics and bioinformatics: facilitating genomic medicine for future health care. *Journal of biomedical informatics.* 2004; 37 : 30-42.
 - Martone ME, Gupta A, Ellisman MH. E-neuroscience: challenges and triumphs in integrating distributed data from molecules to brains. *Nat Neuroscience.* 2004 May; 7(5):467-72.
 - Marty S, Wehrle R, Alvarez-Leefmans FJ, Gasnier B, Sotelo C. Postnatal maturation of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter expresión and inhibitory sinaptogénesis in the rat hippocampus: an immunocytochemical análisis. *Eur J neurosci.* 2002; 15(2) : 233-45.
 - Masson SA. Diccionario terminológico de ciencias médicas. Barcelona; 2000.
 - Mattson MP, Dou P, Kater SB. Pruning of hippocampal pyramidal neurons dentritic architecture in-vitro by glutamate and a protective effect of GABA plus diazepam. *Soc Neurosci Abst.* 1987; 13: 367.
 - Mattson MP. Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain research reviews.* 1988; 13: 179-212.
 - McConnell SK. Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. *Brain research reviews.* 1988 Jan; 13(1): 1-23.

- Meinecke DL, Rakic P. Developmental expression of GABA and subunits of the GABA-A receptor complex in an inhibitory synaptic circuit in the rat cerebellum. *Brain-Res-Dev-Brain-Res.* 1990; 55(1):73-86.
- Mellor JR, Merlo D, Jones A, Wisden W, Randall AD. Mouse cerebellar granule cells differentiation: Electrical activity regulates the GABA-A receptor $\alpha 6$ subunit gene. *J Neurosci.* 1998 April; 18(8): 2822-2833.
- Merchan-Perez A. et al Immunocytochemical detection of glutamate decarboxylase in the postnatal developing rat organ of Corti. *Int.J Dev Neurosci.*1990; 8(5) : 613-20.
- Merchan-Perez A. et al. Ontogeny of glutamate decarboxylase and gamma-aminobutyric acid immunoreactivities in the rat cochlea. *Eur-Arch-Otorhinolaryngol.*1990; 248 (1): 4-7.
- Merchan-Perez A, Gil-Loyzaga P, Lopez-Sanchez J, Eybalin M, Valderrama FJ. Ontogeny of gamma-aminobutyric acid in efferent fibers to the rat cochlea. *Dev brain res.* 1993; 76(1): 33-41.
- Meredith RM, Floyer-Lea AM, Paulsen O. Maturation of long-term potentiation induction rules in rodent hippocampus: role of GABAergic inhibition. *J neurosci.* 2003; 2(35) : 11142-11146.
- Miao N. Wang M. Ott JA. D'Allessandro JS. Woolf TM. Bumcrot DA. Mahanthappa NK. Pang K. Sonic hedgehog promotes the survival of spscific CNS neuron populations and protects these cells from toxic insult in vitro. *J Neurosci.* 1997 Aug; 17(15): 5891-5899.
- Micheva KD, Beaulieu C. Development and plasticity of the inhibitory neocortical circuitry with emphasis on the rodent barrel field cortex: a review. *Canadian J physiol pharmacol.* 1997 May ; 75(5): 470-8.
- Mienville JM. Persistent depolarizing action of GABA in rat Cajal-Retzius cells. *J. Physiol.* 1998 Nov; 512(3): 809-17.
- Miller MW. Cogeneration od retrogradely labeled cortico-cortical projection and GABA-immunoreactive local circuit neurons in neocortex. *Dev brain res* 1985; 23: 187-192.

- Miller MW. The migration and neurochemical differentiation of gamma-aminobutyric acid (GABA)-immunoreactive neurons in rat visual cortex as demonstrated by a combined immunocytochemical-autoradiographic technique. *Developmental Brain research* 1986; (28):41-46.
- Miller MW. Development of projection and local circuit neurons in neocortex. *Cerebral Cortex*, New York: Plenum 1988, vol 7; 133-175.
- Miller MW. Relationship of the time of origin and death of neurons in rat somatosensory cortex: barrel versus septal cortex and projection versus local circuit neurons. *J com neurol.* 1995; 355:6-14.
- Minelli A, Barbaresi P, Conti F. Postnatal development of high-affinity plasma membrane GABA transporters GAT-2 and GAT-3 in the rat cerebral cortex. *Dev brain res.* 2003; 142 (1): 7-18.
- Misgeld U, Zeilhofer HU, Swandulla D. Synaptic modulation of oscillatory activity of hypothalamic neuronal networks in vitro. *Cell mol neurobiol.* 1998 Feb; 18(1): 29-43.
- Miyoshi G, Bessho Y, Yamada S, Kageyama R. Identification of a novel basic helix-loop-helix gene, Heslike, and its role in GABAergic neurogenesis. *J Neurosci.* 2004 Apr; 24(14): 3672-82.
- Mize RR, Salt TE. Contribution of GABAergic inhibition to synaptic response and LTD early in postnatal development in the rat superior colliculus. *Eur. J Neurosci.* 2004 Sep; 20(5):1331-40.
- Mohrmann R, Werner M, Hatt H, Gottmann K. Target-specific factors regulate the formation of glutaminergic transmitter release sites in cultured neocortical neurons. *J neurosci.* 1999; 19(22): 10004-13.
- Molander C, Grant G. Spinal cord cytoarchitecture. 1995. In G. Paxinos (Ed) *The rat nervous system*. Second edition, Academic Press. San Diego.
- Momose-Sato Y, Honda Y, Sasaki H, Sato K. Optical imaging of large-scale correlated wave activity in the developing rat CNS. *J neurophysiol.* 2005 Aug; 94(2):1606-22.

- Montpied P, Yan GM, Paul SM, Morrow AL. Transient increase in cerebellar transcriptional activity precedes the expresión of GABA-A receptor alpha 6 subunit mRNA during postnatal maturation. *Dev neurosci.* 1998; 20(1) : 74-82.
- Mora F, Sanguinetti AM. *Diccionario de Neurociencia.* Alianza Editorial. Madrid. 2004.
- Mott DD, Lewis DV. GABA-B receptors mediate desinhibition and facilitate long-term potentiation in the dentate gyrus. *Epilepsy-Res-Suppl.* 1992; 7: 119-34.
- Mugnaini E, Oertel WH. *Handbook of Chemical Neuroanatomy Vol 4: GABA and Neuropeptides in CNS, Part I.* 1st ed. Ámsterdam: A Björklund and Hökfelt editors. Elsevier Science Publishers BV; 1985
- Nicolelis MA. et all. Development of direct GABAergic projections from the zona incerta to the somatosensory cortex in the rat. *Neuroscience.* 1995; 65(2):609-31.
- Nieto Sampedro M. Plasticidad neural. *Mente y cerebro. Investigación y Ciencia.* 2003; 4: 11-19.
- Nieuwenhuys R. Donkelaar H.J. Nicholson C. *The central nervous system of vertebrates. Vol 3 (mamíferos).* Springer-Verlag. Berlin 1998.
- Nishi J. Learning model for coupled neural oscillators. *Network.* 1999 Aug; 10(3):213-26.
- Nissen UV, Mochida H, Glover JC. Development of projection-specific interneurons and projection neurons in embryonic mouse and rat spinal cord. *J. comp. Neurol.* 2005 Feb; 48(1):30-47.
- Núñez JL, Bambrick LL, Krueger BK; McCarthy MM. Prolongation and enhancement of gamma-aminobutyric acid receptor mediated excitation by chronic treatment with estradiol in developing rat hippocampal neurons. *Eur. Journal neuroscience.* 2005 Jun; 21(12):3251-61.

- Obrietan K, Van den Pol AN. GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversion from Ca^{+2} elevating to depressing. J Neurosci 1995 Jul; 15(1): 5065-77.
- Obrietan K, Van den Pol A. GABA-B receptor-mediated regulation of glutamate activated calcium transients in hypothalamic and cortical neuron development. J neurophysiol. 1999 Jul; 82(1): 94-102.
- Ogurusu T, Yanagi K, Watanabe M, Fukaya M, Shingai R. Localization of GABA receptor $\rho 2$ y $\rho 3$ subunits in rat brain and functional expression of homooligomeric $\rho 3$ receptors and heterooligomeric $\rho 2\rho 3$ receptors. Receptors and channels. 1999; 6(69): 463-75.
- Onteniente B, Nothias F, Geffard M, Peschanski M. Maturation and fine structure of thalamic reticular neurons transplantation into the adult rat CNS. Dev Neurosci. 1992; 14(2): 130-43.
- Osborne NN, Patel S, Beraton DW, Neuhoff V. GABA neurons in retinas of different species and their postnatal development in situ and in culture in the rabbit retina. Cell and tissue research. 1986; 243(1): 117-23
- Otsuka M, GABA and some other transmitter candidates in the nervous system. V International Congress on Pharmacology; 1973. 4; 186-201.
- Ouardouz M, Sastry BR. Activity-mediated shift in reversal potential of GABAergic synaptic currents in immature neurons Brain Res Dev Brain Res. 2005 Nov; 160(1): 78-84.
- Ovtscharoff W, Eusterschulte B, Zienecker R, Reisert I, Pilgrim C. Sex differences in the densities of dopaminergic fibers and GABAergic neurons in the prenatal rat striatum. The Journal of comparative neurology. 1992; 323(2): 299-304.
- Owens DF, Boyce LH, Davis MB, Krisegstein AR. Excitatory GABA responses in embryonic and neonatal cortical slices demonstrated by gramicidin perforated-patch recordings and calcium imaging. J neurosci. 1996 Oct; 16(20):6414-23.

- Owens DF, Liu X, Kriegstein AR. Changing properties of GABA(A) receptor-mediated during early neocortical development. *J. Neurophysiol.* 1999 Aug; 82(2):570-83.
- Park DS, Park JS, Yeon DS. The effects of laminin on the characteristics and differentiation of neuronal cells from epidermal growth factor-responsive neuroepithelial cells. *Yonsei medical journal* 1998 Apr; 39(2): 130-40.
- Parnavelas JG, Barfield JA, Franke E, Luskin MB. Separate progenitor cells give rise to pyramidal and nonpyramidal neurons in the rat telencephalon. *Cerebral Cortex.* 1991 Nov-Dec; 1(463-468): 1047-3211.
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4th ed. San Diego: Academic Press. Elsevier;1998.
- Perrot-Sinal TS, Davis AM, Gregerson KA, Kao JP, McCarthy MM. Estradiol enhances excitatory gamma-aminobutyric acid-mediated calcium signaling in neonatal hypothalamic neurons. *Endocrinology.* 2001 Jun; 142(6): 2238-43.
- Perouansky M, Grantyn R. Development of gabaergic synaptic connections in-vivo and in cultures from rat superior colliculus. *Dev Brain res.* 1990 Mar; 52 (1-2): 95-111.
- Pesold C, Liu WS, Guidotti A, Costa E, Caruncho HJ. Cortical bitufted, horizontal, and Martinotti cells preferentially express and secrete reelin into perineuronal nets, nonsynaptically modulating gene expression. *Proceedings of the national academy of sciences of USA* 1999 March; 96(6): 3217-22.
- Phelps PE, Alijan A, Tran TA. Ventrally located commissural neurons express the gabaergic phenotype in developing rat spinal cord. *The journal of comparative neurology* 1999; 409: 285-298.
- Pike FG, Meredith RM, Holding AW, Paulsen O. Rapid report: postsynaptic bursting is essential for "Hebbian" induction of associative long-term potentiation at excitatory synapses in rat hippocampus. *J.Physiol.* 1999 Jul; 518 (2): 5711-6.

- Plaschke M, Naumann T, Kasper E, Bender R, Frotscher M. Development of cholinergic and GABAergic neurons in the rat medial septum: effect of target removal in early postnatal development. *J. Comp Neurol.* 1997; 379(4): 467-81.
- Plotkin MD, Zinder EY, Hebert SC, Delpire E. Expresión of the Na-K-2Cl cotransporter is developmentally regulated in postnatal rat brains: a posible mechanims underlying GABA's excitatory role in immature brain. *J neurobiol.* 1997; 33(6): 781-95.
- Plotkin JL, Wu N, Chesselet MF, Levine MS. Functional and molecular development of striatal fast-spiking GABAergic interneurons and their cortical inputs. *Eur J. Neurosci.* 2005 Sep; 22(5): 1097-108.
- Poulter MO, Barker JL, O'Carroll A.M, Lolait S, Mahan LC. Differential and transient expresión of GABA-A receptor alpha-subunit mRNAs in the developing rat CNS. *J neurosci.* 1992; 12 (8) : 2888-900.
- Poulter MO, Barker JL, O'Carroll AM, Lolait SJ, Mahan LC. Co-existent expresión of GABA-A receptor beta 2, beta 3, and gamma 2, subunit Messenger RNAs during embryogenesis and early postnatal development of the rat central nervous system. *Neuroscience* 1993; 53(4):1019-33.
- Pozza MF, Manuel NA, Steinmann M, Froestl W, Davies CH. Comparison of agonist potencies at pre- and post synaptic GABA-B receptors at inhibitory synapses in the CA1 region of the rat hippocampus. *British Journal of Pharmacology.* 1999 May; 127(1):211-9.
- Prosser CL, *Comparative animal physiology.* 4ª ed. New York: Wiley-Liss; 1991.
- PubMed. Bases de datos en Biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid. www.ncbi.nlm.nih.gov
- Radik P. Developmental events leading to laminar and areal organization of the neocortex. In: Schmitt F.O. (ed). *The organization of the cerebral cortex.* MIT Press, Cambridge , MA. Pp: 7-28, 1981.

- Reece LJ, Lim CH. Onset of the optic nerve conduction and synaptic potentials in superior colliculus of fetal rats studied in vitro. *Brain research. Developmental brain research*. 1998 Mar; 106(1-2): 25-38
- Reichling DB, Kyrozis A, Wang J, MacDermott AB. Mechanisms of GABA and glycine depolarization-induced calcium transient in rat dorsal horn neurons. *Journal of physiology* 1994; 476: 411-421
- Reisert I, Lieb K, Beyer C, Pilgrim C. Sex differentiation of rat hippocampal GABAergic neurons. *European journal of neuroscience*. 1996;8(8): 1718-24.
- Represa A, Ben-Ari Y. Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci*. 2005; 28(6):278-83.
- Ren J, Greer JJ. Modulation of respiratory rhythmogenesis by chloride-mediated conductances during the perinatal period. *J. Neurosci*. 2006 Apr; 26(14):3721-30.
- Rigo A, Genescá G. Cómo presentar una tesis y trabajos de investigación. Barcelona. Eumo-Octaedro.2002.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Latinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC-2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999; 397(6716): 251-5.
- Rivera C, Voipio J, Kaila K. Two developmental switches in gabaergic signalling: K⁺Cl⁻-cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *J.Physiol*. 2005 May; 564 (3): 953.
- Robain O, Barbin G, Ben Ari Y, Rozenberg F, Prochiantz A. Gabaergic neurons of the hippocampus: development in homotopic grafts and in dissociated cells cultures. *Neuroscience*. 1987; 23(1): 73-86.
- Robertson RT et al. Neuroanatomical research techniques. Methods in physiological psychology. Vol II, Academic Press Inc. New York. 1978.
- Robertson RT, Annis CM, Baratta J, Haraldson S, Ingeman J, Kageyama GH, Kimm E, Yu J. Do subplate neurons comprise a transient population

- of cells in developing neocortex of rats?. The journal of comparative neurology. 2000; 426(4): 632-50.
- Rosina A, Morara S, Provini L. GAT-1 developmental expression in the rat cerebellar cortex: basket and pinceau formatiuon. Neuroreport.1999 Jan 18; 10(1): 27-32.
 - Roth G. Bases nerviosas de la conciencia. Mente y Cerebro. Investigación y Ciencia. 2002; 1: 12-21.
 - Rozenberg F, Robain O, Jardin L, Ben Ari Y. Distribution of GABAergic neurons in late fetal and early postnatal rat hippocampus. Brain research. Developmental brain research 1989; 50 (2): 177-87.
 - Rozzo A, Armelin M, Franzot J, Chiaruttini C, Nistri A, Tongiorgi E. Expression and dendritic mRNA localization of GABA-C receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. European Journal of neuroscience. 2002 Jun; 15 (11): 1747-58.
 - Ruiz A. Diccionario esencial de neuroanatomía. Sinónimos y epónimos. Valencia. Universidad de Valencia; 2001.
 - Rumigny JF, Cashh C, Mandel P, Maitre M. Ontogeny and distribution of specific succinic semialdehyde reductase apoenzyme in the rat brain. Neurochemical research. 1982 May; 5: 555-61.
 - Runquist M, Alonso G. Gabaergic signaling mediates the morphological organization of astrocytees in the adult rat forebrain. Glia 2003 Jan ; 41(2); 137-151.
 - Rymar VV, Sasseville R, Luk KC, Sadikot AF. Neurogenesis and stereological morphometry of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons of the neostriatum. Journal com. Neurol. 2004 Feb; 469(3): 325-39.
 - Saito K. et all. Postnatal development of the GABA system in the rat spinal cord. Japanese Journal of Pharmacology. 1982; 32(1):1-7.
 - Safiulina VF, Fattorini G, Conti F, Cherubini E. GABAergic signaling at mossy fiber synapsis in neonatal hippocampus. J Neurosci. 2006 Jan; 26(2):597-608.

- Sakatani K. et al. Transient presence and functional interaction of endogenous GABA and GABA-A receptors in developing rat optic nerve. *Proc-R-Soc-Lond-B-Biol-Sci.* 1992; 247 (1319): 155-61.
- Sands SA, Purisai MG, Chronwall BM, Enna SJ. Ontogeny of GABA (B) receptor subunit expresión and function in the spinal cord. *Brain Res.* 2003 May; 972(1-2):197-206.
- Sanes DH, Reh TA, Harris WA. El desarrollo de sistema nervioso. Barcelona, Ariel neurociencia; 2002.
- Sankar R, Shin DH, Wasterlain CG. GABA metabolism during status epilepticus in the developing rat brain. *Dev brain res.* 1997 Jan; 98(1): 60-4.
- San-Molina J, Castillo ES. Desarrollo de un modelo geométrico-funcional de base neuroanatómica en el estudio de los procesos mnésicos. *Cerebro y Memoria*, 2004, Fundación Mapfre Medicina; 231-234.
- Schaffner AE, Behar T, Nadi S, Smallwood V, Barker JL. Quantitative analysis of transient GABA in embryonic and early postnatal rat spinal cord neurons.
- Schomberg SL, Bauer J, Kintner DB, Su G, Flemmer A, Forbush B, Sun D. Cross talk between the GABA-A receptor and the Na-K-Cl cotransporter is mediated by intracellular Cl⁻. *J Neurophysiol.* 2003 Jan; 89(1): 159-67.
- Schousboe A, Waagepetersen HS. Glial modulation of GABAergic and glutamatergic neurotransmission. *Curr Top Med Chem.* 2006; 6(10): 929-34.
- Segal M, Barker JL, Owen DG. Chloride conductances in central neurons. *Isr J Med Sci.* 1987 Jan-Feb; 23(1-2):95-100.
- Segovia J, Meloni R, Gale K. Effect of dopaminergic denervation and transplant-derived reinnervation on a marker of striatal GABAergic function. *Brain Res.* 1989 Jul; 493(1):185-9.

- Seno N, Saito K. The development of the dorsal root potential and the responsiveness of the primary afferent fibers to gamma-aminobutyric acid in the spinal cord of rat fetuses. *Brain res.* 1985; 349(1-2): 11-16.
- Serafín R, Valayev AY, Barker JL, Poulter MO. Depolarizing GABA-activated Cl⁻ channels in embryonic rat spinal and olfactory bulb cells. *J physiol.* 1995; 488(2) : 371 – 386.
- Serafín R, Ma W, Maric D, Maric I, Lahjouji F, Siegart W, Barker JL. Initially expressed early rat embryonic GABA-A receptor Cl⁻ ion channels exhibit heterogeneous channel properties. *Eur J neurosci.* 1998; 10(5): 1771-83.
- Seress L, Ribak CE. The development of GABAergic neurons in the rat hippocampal formation. An immunocytochemical study. *Developmental Brain Research*, 1988; 44: 197-209.
- Sgaravatti AM, Sgarbi MB, Testa CG, Durigon K, Pederzoli CD, Prestes CC, Wyse AT, Wannmacher CM, Wajner M, Dutra-Filho CS. Gamma-hydroxybutyric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. *Neurochem Int.* 2007;50(3): 64-70.
- Shibata S, Kakazu Y, Okabe A, Fukuda A, Nabekura J. Experience-dependent changes in intracellular Cl⁻ regulation in developing auditory neurons. *Neurosci. Res.* 2004; 48: 211-220.
- Sivilotti L, Nistri A. GABA receptor mechanisms in the Central Nervous System. *Progress in Neurobiology-Pergamon Press.* 1991; 36: 35-92. 1991.
- Sipila S, Huttu K, Voipio J, Kaila K. GABA uptake via GABA transporter-1 modulates GABAergic transmission in the immature hippocampus. *J. Neuroscience.* 2004 Jun; 24(26): 5877-80.
- Sipila ST, Huttu K, Soltesz I, Voipio J, Kaila K. Depolarizing GABA acts on intrinsically bursting pyramidal neurons to drive giant depolarizing potentials in the immature hippocampus. *J. Neurosci.* 2005Jun;25(22):5280-9.

- Sloviter RS, Ali-Akbarian L, Horvath KD, Menkens KA. Substance P receptor expression by inhibitory interneurons of the rat hippocampus: enhanced detection using improved immunocytochemical methods for the preservation and colocalization of GABA and other neuronal markers. *Journal of Comparative Neurology* 2001; 430(3):283-305.
- Smeets W, Reiner A. Phylogeny and development of catecholamine systems in the CNS of vertebrates. Cambridge University Press. Cambridge 1994.
- Smith CM, Elements of Molecular Neurobiology. 2nd ed. New York: John Wiley & son Ltd; 1997.
- Snyder S. Drogas y Cerebro. Barcelona: Biblioteca Scientific American. Prensa Científica S.A. 2000.
- Solbach S, Celio MR. Ontogeny of the calcium binding protein parvalbumin in the rat nervous system. *Anatomy and embryology*. 1991; 184(2): 103-24.
- Somogyi R, Wen XM, Ma W, Barker JL. Developmental kinetics of GAD family mRNA parallel neurogenesis in the rat spinal cord. *The Journal of Neuroscience*. 1995 April; 15(4): 2575-2591.
- Song W, Chattipakorn SC, McMahon LL. Glycine-gated chloride channels depress synaptic transmission in rat hippocampus. *J Neurophysiol*. 2006 Apr; 95(4): 2366-79. Epub.
- Sphepherd GM. Neurobiología. 1ª ed. Madrid: Editorial Labor; 1990.
- Strata F, Atzori M, Molnar M, Ugolini G, Tempai F, Cherubini E. A pacemaker current in dye-coupled hilar interneurons contributes to the generation of giant gabaergic potentials in developing hippocampus. *J neurosci*. 1999 Feb;17 (4):1435-1446.
- Strata F, Atzori M, Molnar M, Ugolini G, Berretta N, Cherubini E. Nitric oxide sensitive depolarization-induced hyperpolarization: a possible role for gap junctions during development. *Eur J neurosci*. 1998; 10:397-403.
- Su CK, Chai CY. GABAergic inhibition of neonatal rat phrenic motoneurons. *Neurosci. lett*. 1998 Jun; 248(3): 191-4.

- Sun D, Murali SG. Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter in immature cortical neurons: A role in intracellular Cl⁻ regulation. *J neurophysiol.* 1999; 81(4): 1939-48.
- Sutor B, Luhman HJ. Development of excitatory and inhibitory postsynaptic potentials in the rat neocortex. *Perspect Dev Neurobiol.* 1995;2(4):409-19.
- Suzuki T, Takagi R, Kawashima K. Picrotoxin increased acetylcholine release from rat cultured embryonic septal neurons. *Neuroscience letters* 2004; 356: 57-60.
- Swanson L.W. *Brain Maps: Structure of the Rat Brain.* 2nd ed. Elsevier Science B.V. Ámsterdam The Netherlands. 1998.
- Swanwick CC, Murthy NR, Mtchedlisvili Z, Seighart W, Kapur J. Development of gamma-aminobutyric acidergic synapses in cultured hippocampal neurons. *J comp. Neurol.* 2006 Apr; 495(5):497-510.
- Szabat E, Vanhatalo S, Soinila S. The ontogenic appearance of tyrosine hydroxylase – serotonin – gamma-aminobutyric acid, calcitonin gene-related peptide-, substance P, and synaptophysin-immunoreactivity in rat pituitary gland. *Int Dev Neurosci.* 1998 Oct; 16(6): 449-60.
- Szabo G, Kartarova Z, Hoertnagi B, Somogyi R, Sperk G. Differential regulation of adult and embryonic glutamate decarboxylase in rat dentate granulate cells after kainate-induced limbic seizures. *Neuroscience* 2000; 100(2): 287-95.
- Tallman JF, Thomas JW, Gallager DW. GABAergic modulation of benzodiazepine binding site sensitivity. *Nature* 1978; 274: 383-385.
- The mouse brain library. Disponible en: http://www.mbl.org/atlas232/atlas232_frame.html
- Thompson CL, Pollard S, Stephenson FA. Developmental regulation of expresión of GABA-A receptor alpha 1 and alpha 6 subunits in cultured rat cerebellar granule cells. *Neuropharmacol.* 1996; 35(9-10): 1337-46.
- Thompson SE, Ayman G, Woodhall GL; Jones RS. Depression of Glutamate and GABA release by presynaptic GABA(B) receptors in the

- entorhinal cortex in normal and chronically epileptic rats. *Neurosignals*, 2007; 15(4):202-215.
- Titz S, Hormuzdi S, Lewen A, Monyer H, Misgeld U. Intracellular acidification in neurons induced by ammonium depends on KCC2 function. *Eur J Neurosci*. 2006 Jan; 23(2):454-64.
 - Tohyama M, Takatsuji K. Atlas of Neuroactive substances and their receptors in the rat. 1st ed. japones 1993. Oxford: Oxford University Press; 1997.
 - Torimitsu K, Niwa O. Real time detection of GABA-induced synaptic glutamate release in cultured rat cortex. *Neuroreport*. 1997 Apr; 8(6): 1353-8.
 - Törk I. Raphe nuclei and serotonin containing systems. The rat nervous system Vol 2. 1st ed. Editado por George Paxinos. New York: Academic Press;1985.
 - Tracey DJ, Paxinos G, Stone J. Neurotransmitters in the Human Brain. Advances in behavioral biology. 1st ed. New York: Plenum Press; 1995.
 - Tran TS, Cohen-Cory S, Phelps PE. Embryonic GABAergic spinal commissural neurons project rostrally to mesencephalic targets. *Journal comp. neurol*. 2004 Jul; 475(3): 327-39.
 - Tsai B. Information landscaping: information, mapping, charting, querying and reporting techniques for total quality knowledge management. *Information processing and management*. 2003; 39 : 639-644.
 - Tsukada M, Pan X. The spatiotemporal learning rule and its efficiency in separating spatiotemporal patterns. *Biol. Cybern.*2005 Feb; 92(2):139-46.
 - Turgeon SM, Albin RL. Postnatal ontogeny of GABA-B binding in rat brain. *Neuroscience* 1994 Sep; 62(2): 601-13.
 - Tyzio R, Represa A, Jorquera I, Ben-Ari Y, Gozlan H, Aniszkstejn L. The establishment of GABAergic and glutamatergic synapsis on CA1 pyramidal neurons is sequetial and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci*. 1999 Dec; 19(23):10372-82.

- Usui S, Yasmaguchi I, Ikeno H, Takebe K, Fujii Y, Okumura Y. Visiome environment: enterprise solution for neuroinformatics in vision science.
- Uylings HM, Van Eden CG, Parnavelas JG, Kalsbeek A. The prenatal and postnatal development of the rat cerebral cortex. *The cerebral cortex of the rat*. MIT Press Cambridge. MA 1990 pp 35-76.
- Vaccarino FM, Schwartz ML, Hartigan D, Leckman JF. Basic fibroblast growth factor increases the number of excitatory neurons containing glutamate in the central cortex. *Cerebral Cortex*. 1995; 1-64-78: 1047-3211.
- Vale C, Caminos E, Martinez-Galan JR, Juiz JM. Expression and developmental regulation of the K⁺-Cl⁻-cotransporter KCC2 in the cochlear nucleus. *Hear Re*. 2005 Aug; 206(1-2): 107-15.
- Valeyev AY, Cruciani RA, Lange GD, Smallwood VS, Barker JL. Cl⁻ channels are randomly activated by continuous GABA secretion in cultured embryonic rat hippocampal neurons. *Neurosci lett*. 1993; 155: 199-203.
- Van den Pol AN, Obrietan K, Chen G. Excitatory actions of GABA after neuronal trauma. *J. Neuroscience*. 1996 Jul; 16(13): 4283-92.
- Van den Pol AN. GABA immunoreactivity in hypothalamic neurons and growth cones early development in vitro before synaptic formation. *J Com Neurol* 1999 Jun; 383(2): 178-88.
- Van Eden CG, Parmar R, Lichtensteiger W, Schlumpf M. Laminar distribution of GABA-A receptor alpha 1, beta 2, and gamma 2 subunits mRNAs in the granular and agranular frontal cortex of the rat during pre and post natal development. *Cerebral cortex* 1995; 5(3) ; 234-46.
- Van Eden CG, Mrzljak L, Voorn P, Uylings HB. Prenatal development of GABAergic neurons in the neocortex of the rat. *The Journal of Comparative neurology*. 1989; 289(2): 213-27.
- Vancouver style. References / Bibliography. 18 Agosto 2004. <<http://www.library.uq.edu.au/training/citation/vancouv.html>>

- Van Pelt J, Van Ooyen A, Uylings HB. The need for integrating neuronal morphology databases and computational environments in exploring neuronal strcuture and function. *Anat Embryol* 2001 Oct; 204(4): 255-65.
- Vautrin J, Schaffner AE, Barker JL. Quantal and subquantal GABAergic transmisión in cultured rat hippocampal neurons. *Hippocampus*. 1993 Jan; 3(1):93-101.
- Vernadakis A, Woodbury DM. Electrolyte and amino acid changes in rat brain during maturation. *Am Journal Physiol.*1962; 203: 748-752.
- Versaux-Botteri C. et all. Immunohistochemical localization of GABA-containing neurons during postnatal development of the rat retina. *Invest-Ophthalmol-Vis-Sci*. 1989; 30(4) : 652-9.
- Vincent SL, Pabreza L, Benes FM. Postnatal maturation of GABA-immunoreactive neurons of the rat medial prefrontal cortex. *J comp. Neurol*. 1995; 355(1):81-92.
- Virgili et all. Regional maturation of the neurotransmitter-related and glial markers during postnatal development in the rat. *International Journal of Neuroscience*. 1990; 8(2): 159-66.
- Von Boleen O. Dermietzel R, Neurotransmitters and Neuromodulators. 1st ed. Wiley-VCH Verlag GMBH Winheim; 2002.
- Voogd J, Gerrits NM, Marani E. Cerebellum. The rat nervous system Vol 2. Ed. George Paxinos. New York: Academic Press; 1985.
- Vu TQ, Payne JA, Copenhagen DR. Localization and developmental expresión patterns of neuronal K-Cl cotransporter (KCC2) in the rat retina. *J neurosci*. 2000; 20(4): 1414-23.
- Waite PM, Ho SM, Henderson TA. Afferent ingrowth and onset of activity in the rat trigeminal nucleus. *Eur J neurosci*. 2000 Aug; 12(8): 2781-92.
- Walmsley B, Berntson A, Leao RN, Fyffe RE. Activity-dependent regulation of synaptic strength and neuronal excitability in central auditory pathway. *J. Physiol*. 2006 Feb; Epub ahead of print.

- Walton MK, Schaffner AE, Barker JL. Sodium channels, GABA -A receptors and glutamate receptors develop sequentially on embryonic rat spinal cord cells. *Journal of Neuroscience* 1993; 13(5): 2068-84.
- Wang J, Reichling DB, Kyrozis A, MacDermott AB. Developmental loss of GABA and glycine-induced depolarization and Ca^{+2} transients in embryonic rat dorsal horns neurons in culture. *Eur J. neurosci.* 1994; 6(8):1275-80.
- Wang C, Ohno K, Furukawa T, Ueki T, Ikeda M, Fukuda A, Sato K. Differential expression of KCC2 accounts for the differential GABA responses between relay and intrinsic neurons in the early postnatal rat olfactory bulb. *Eur. J. Neurosci.* 2005 Mar; 21(5): 1449-55.
- Warton SS, Perouansky M, Grantyn R. Development of gabaergic synaptic connections in-vivo and in cultures from rat superior colliculus. *Developmental Brain research* 1990; 52 (1-2): 95-111.
- Wertheim SL. NeuroDatabase: multimedia exploration of nervous system. *Proc Annu Symp Comput Appl Med Care* 1991; 985-6.
- Wiens SC, Trudeau VL. Thyroid hormones and gamma-aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2006 March; Epub ahead of print.
- Wiggins B. Knowledge management – Reviews. *International Journal of information management.* 2000; 20 : 405-408.
- Williams JR, Sharp JW, Kumari VG, Wilson M, Payne JA. The neuron-specific K-Cl cotransporter, KCC2. Antibody development and initial characterization of the protein. *J biol chem.* 1999; 274(18) : 12656-64.
- Wisden W, Korpi ER, Bahn S. The cerebellum: a model system for studying GABA-A receptor diversity. *Neuropharmacology.* 1996; 35 (9-10): 1139-1160.
- Wolff JR. Evidence for a dual role of GABA as synaptic transmitter and promoter of synaptogenesis. *Advances in biochemical psychopharmacology.* 1981; 459-466.

- Wolters A, Sandbrink F, Schlottmann A, Kunesch E, Stefan K, Colten LG, Benecke R, Classen J. A temporally asymmetric Hebbian rule governing plasticity in the human motor cortex. *J Neurophysiol*. 2003 May; 89(5):2339-45.
- Wonders C, Anderson SA. Cortical interneurons and their origins. *Neuroscientist*. 2005 Jun; 11(3):199-205.
- Wong P.T. et al. Postnatal changes of GABAergic and glutamatergic parameters. *Brain-Res*. 1981; 227(4):519-29. involved in the control of respiration. *Respir Physiol Neurobiol*. 2005 Nov; 149 (1-3): 83-98.
- Wong-Riley MT, Liu Q. Neurochemical development of brain stem nuclei
- Wu WL, Ziskind-Conhaim L, Sweet MA. Early development of glycine and GABA-mediated synapses in rat spinal cord. *The Journal of neuroscience* 1992; 12(10): 3935-45.
- Xia Y, Hadad GG. Ontogeny and distribution of GABA-A receptors in the rat brainstem and rostral brain regions. *Neuroscience* 1992; 49(4) : 973-89.
- Xu H, Whelan PJ, Wenner P. Development of an inhibitory interneuronal circuit in the embryonic spinal cord. *J. Neurophysiol*. 2005 May; 93(5):2922-33.
- Yamada J, Okabe A, Toyoda H, Kilb W, Luhmann HJ, Fukuda A. Cl⁻ uptake promoting depolarizing GABA actions in immature rat neocortical neurons is mediated by NKCC-1. *J. physiol*. 2004 Jun; 557(3):829-41.
- Yamasaki EN, Barbosa VD, De Mello FG, Hokoc JN. GABAergic system in the developing mammalian retina: dual sources of GABA at the early stages of postnatal development. *International Journal of the developmental neuroscience*. 1999 Jun; 17(3):201-13.
- Yebes E, Romero C. Guías visuales. PowerPoint 2003. Madrid: Ediciones Anaya Multimedia; 2004.
- Yoshiota M, Tashiro Y, Inoue K, Kawai Y. Postnatal development of GABAergic axon terminals in the rat nucleus of tractus solitarius. *Brain Res*. 2006 Aug; 1107(1): 111-20.

- Zaidi SI, Jafri A, Martin RJ, Haxhiu MA. Adenosine A (2A) receptors are expressed by GABAergic neurons of edulla oblongata in developing rat. *Brain Res.* 2006 Feb; 1017(1):42-53. Epub.
- Zhang JH, Satpo M, Tahyama M. Different postnatal development profiles of neurons containing distic GABA-A receptor beta subunit mRNAs (beta 1, beta 2, and beta 3) in the rat forebrain. *J comp neurol.* 1991; 308(4) : 586-613.
- Zhang L, Chang YH, Feldman AN, Ma W, Lahjouji F, Barker JL, Hu Q, Maric D, Li BS, Li W, Rubinow DR. The expression of GABA(A) receptor alph2 subunit is upregulated by testosterone in rat cerebral cortex. *Neurosci. lett.* 1999; 265(1):25-8.
- Zhao X, Shoji S, Lau P. Balanced GABAergic and glutamatergic synapse development in hippocampal neurons. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 May;330 (4): 1110-5.
- Zhu Y, Li H, Wu JY, Rao Y. Cellular and molecular guidance of GABAergic neuronal migration of an extracortical origin to the neocortex. *Neuron* 1999 Jul; 23(3): 473-85.
- Ziburkus J, Lo FS, Guido W. Nature of inhibitory postsynaptic activity in developing relay cells of the lateral geniculate nucleus. *J Neurophysiol.* 2003; 90: 1063-1070.
- Ziskind-Conhaim L. Physiological functions of GABA-induced depolarizations in the developing rat spinal cord. *Persp dev neurobiol.* 1998; 5(2-3): 279-87.
- Zuluaga JA. *Neurodesarrollo y estimulación.* Bogota, Colombia: Editorial Médica Panamericana Ltda; 2001.

VII. Apéndice 1: Abreviaturas

- Acetil CoA: Acetil Coenzima A
- ADN: Ácido deoxiribonucleico
- AMP-c: Adenil monofosfato-cíclico
- AMPA: Ácido Alpha-amino-3-hidroxi-5-metil-4 isoxazol propiónico.
- ATP: adenil trifosfato
- Ba: Barrio.
- bp: pares de bases
- β -CCM: metil- β -carbolina-3-carboxilato.
- Ca^{+2} : calcio ionico
- Cl^- : Cloro ionico
- CO^{+2} : Anhídrido carbónico.
- CP: Cortical Plate – Sustrato cortical.
- CRL: Crown-rump lenght – Longitud corona-cuartos traseros
- ECl⁻: Potencial de, equilibrio, reversión o inversión del Cloro
- ED: Embryonic day – Día de gestación embrionaria
- EPSPs: Excitatory post synaptic potencial: Potencial excitador postsináptico
- GABA: Ácido γ -amino butírico
- GABA-T: Ácido γ -amino butírico trans-aminasa
- GABA-A: Receptor A del Ácido γ -amino butírico
- GABA-B: Receptor B del Ácido γ -amino butírico
- GABA-C: Receptor C del Ácido γ -amino butírico
- GAD: Ácido γ -amino butírico descarboxilasa
- GAT 1/4: Transportadores del GABA
- GDP: Guanidil Difosfato
- GDP: Potenciales Gigantes Despolarizantes
- GTP: Guanidil trifosfato
- Glu: Ácido glutámico
- IR: Inmuno reactivas

- IPSPs: Inhibitory post synaptic potencial: Potencial inhibitorio postsináptico.
- K: Potasio
- KD: kiloDalton.
- KCC: Potasio Cloro Cotransportador
- LTP: Long Term Potenciation - Potenciación a largo plazo.
- LTD: Long Term Deprivation- Deprivación/Supresión a largo plazo.
- LSO: Oliva Superior Lateral
- mRNA: Ácido ribonucleico – mensajero
- Mg: Magnesio
- μ M: microMolar
- μ m: micrometros.
- mM: miliMolar
- Mn: Manganeseo
- mseg: miliSegundos
- mV: miliVoltios
- Na: Sodio
- Ni: Niquel
- NAD:
- NADH:
- NMDA: Receptor N-metil-D-Aspártico
- Non-NMDA: Receptor No-
- N-metil-D-Aspártico
- NT: Neurotransmisor
- NGF: Neural Growth Factor – Factor de crecimiento neural
- NKCC: Sodio Potasio Cloro Co-transportador
- PND: Postnatal day – Día de vida postnatal
- PP: Primodium plexiforme.
- PV: Parvoalbumina.
- SNC: Sistema nervioso central.
- Sr: Estroncio.
- SV: Subventricular Zone – Zona subventricular

- TH: Tirosina hidroxilasa.
- UMLS: Unifed Medical Language System – Sistema de lenguaje medico unificado.
- Vm: Potencial de membrana
- VZ: Ventricular Zone – Zona ventricular

VII. Apéndice 2: Índice de figuras

1. Introducción

Figura 1.1. Síntesis de GABA	6
Figura 1.2. Ruta de biosíntesis y degradación del GABA.....	7
Figura 1.3. Ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Ciclo de Krebs ..	8
Figura 1.4. Ruta de degradación del GABA. GABA shunt	9
Figura 1.5. Astrocitos en la brecha sináptica.....	11
Figura 1.6. Niveles intra y extra celulares de diferentes iones	13
Figura 1.7. Sinapsis GABAérgica.	17
Figura 1.8. Gráfica de hiperpolarización de membrana.....	18
Figura 1.9. Gráfica de inhibición silenciosa.	18
Figura 1.10. Gráfica de despolarización de la membrana... ..	19
Figura 1.11. Paso metabólico de la enzima de síntesis.....	22
Figura 1.12. Estructura de la molécula de mefenesin.....	26
Figura 1.13. Estructura de la molécula de meprobamato.....	26
Figura 1.14. Estructura de la molécula de diazepam.. ..	27
Figura 1.15. Estructura de la molécula de GABA.....	28
Figura 1.16. Modelo propuesto para la estructura del receptor GABA-A. ...	31
Figura 1.17. Modelo propuesto para el receptor GABA-A, visión superior con poro central.. ..	32
Figura 1.18. Modelo propuesto de activación del receptor GABA-A.	34
Figura 1.19. Modelo propuesto del receptor GABA-B.....	37
Figura 1.20. Modelo de activación en cascada del receptor GABA-B.. ..	39
Figura 1.21. Esquema de actuación del receptor GABA-B.....	40
Figura 1.22. Médula espinal. Áreas ricas en células GABAérgicas.....	53

Figura 1.23. Médula espinal. Áreas ricas en terminales axónicas GABAérgicas.	53
Figura 1.24. Esquema de la formación reticular.	54
Figura 1.25. Esquema de cerebelo.	55
Figura 1.26. Diferentes tipos celulares presentes en cerebelo. Expresión del GABA y receptores..	57
Figura 1.27. Esquema de tálamo.	58
Figura 1.28. Esquema de hipocampo.....	60
Figura 1.29. Modelo propuesto de funcionamiento de los ganglios basales.	61
Figura 1.30. Esquema de las capas de la corteza cerebral de rata.....	62
Figura 1.31. Esquema del bulbo olfativo.	64
Figura 1.32. Áreas cerebrales ricas en cuerpos celulares GABAérgicos.. ..	65
Figura 1.33. Áreas cerebrales ricas en terminales GABAérgicas.....	66

1.2. Apéndice a la introducción

Figura 1.2.1. Tabla del desarrollo de los diversos niveles cerebrales.	85
Figura 1.2.2. Gráfico del origen de las diferentes estructuras.	86
Figura 1.2.3. Fase I: Zona ventricular.....	95
Figura 1.2.4. Fase II: Pre-estrato.....	96
Figura 1.2.5. Fase III: Estrato cortical y otras capas. ...	99
Figura 1.2.6. Resumen de todas las fases..	102

2. Material y métodos

Figura 2.1. Evolución a lo largo de los años de la producción científica. "GABA & Rat & Development"	12
Figura 2.2. Tipos de corte: Corte coronal y Corte sagital..	129

3. Resultados

Figura 3.1. Imagen coronal de ED-11	134
Figura 3.2. Imagen sagital de ED-11	134
Figura 3.3. Imagen coronal de ED-12	135
Figura 3.4. Imagen sagital de ED-12	136
Figura 3.5. Imagen coronal de ED-13	137
Figura 3.6. Imagen sagital de ED-13	138
Figura 3.7. Imagen coronal de ED-14.....	141
Figura 3.8. Imagen sagital de ED-14	142
Figura 3.9. Imagen coronal de ED-15	144
Figura 3.10. Imagen sagital de ED-15	145
Figura 3.11. Imagen sagital de ED-16	147
Figura 3.12. Imagen coronal de ED-16	148
Figura 3.13. Imagen coronal de ED-17	151
Figura 3.14. Imagen sagital de ED-17	152
Figura 3.15. Imagen sagital de ED-18	154
Figura 3.16. Imagen coronal de ED-18.....	155
Figura 3.17. Imagen sagital de ED-19	157
Figura 3.18. Imagen sagital de ED-20	158
Figura 3.19. Diagrama de médula de ED-21	160
Figura 3.20. Imagen sagital de ED-21	161
Figura 3.21. Cronología vital de la rata	164
Figura 3.22. Niveles endógenos de GABA hasta llegar al nivel de adulto .	165
Figura 3.23. Gradiente de concentración del GABA	166
Figura 3.24. Concentración de GABA en diferentes áreas cerebrales en distintos momentos del desarrollo.....	167

Figura 3.25. Actividad de la enzima GAD en diversas áreas cerebrales	169
Figura 3.26. Imagen sagital de PND-1..	179
Figura 3.27. Imagen sagital del periodo neonatal PND-2 a PND-7..	183
Figura 3.28. Imagen sagital del periodo inmaduro PND-8 a PND-14..	185
Figura 3.29. Imagen sagital del periodo adolescente PND-15 a PND-21 ..	189
 4. Discusión	
Figura 4.1. Tipo de respuesta postsináptica	204
Figura 4.2. Potenciación a largo plazo..	205
Figura 4.3. Receptor GABA-A y su distribución en cerebelo.....	215
Figura 4.4. Desarrollo embrionario verso animal adulto..	218
Figura 4.5. Sistemas de intrusión / extrusión del Cloro..	221